

Aus der Klinik für Innere Medizin III  
(Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin)  
Direktor Prof. Dr. med. M. Böhm  
Fachbereich Klinische Medizin  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung des interstitiellen Remodelling bei  
Kardiomyopathie durch eine kardiale  
 $\beta$ 1-Adrenorezeptor-Überexpression**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2007

Vorgelegt von: Simina-Ramona Selejan,  
geb. am 13.02.1979 in Temeschwar (Rumänien)

#### **Erklärung gemäß § 7 Abs.1 Nr. 4**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Darstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Es hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen und Gewissen gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen Versicherung belehrt.

Homburg, 10.09.07

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Zusammenfassung / Summary</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1. Epidemiologie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz.....	5
2.2. Neuroendokrine Aktivierung als Kompensationsmechanismus bei der chronischen Herzinsuffizienz.....	7
2.2.1 Das $\beta$ -adrenerge System.....	9
2.2.2 $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion bei der chronischen Herzinsuffizienz.....	10
2.3 Kardiales Remodelling - morphologische Anpassungsprozesse.....	12
2.3.1 Das myokardiale Interstitium.....	13
2.3.2 Interstitielle Umbauvorgänge durch Matrix Metalloproteinasen und deren Inhibitoren.....	14
2.3.2.2 Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	18
2.3.2.3 Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs).....	23
2.4 Fragestellung.....	25
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Material.....	27
3.1.1 Verwendete Substanzen.....	27
3.1.2 Antikörper für Westernblot-Analyse.....	30
3.1.2.1 Proteinspezifische Elektrophorese- und Blot-Bedingungen.....	31
3.1.3 Primer für RT-PCR.....	34
3.1.4 Verwendete Lösungen.....	35
3.1.4.1 Lösungen für Westernblot-Analyse.....	35
3.1.4.2 Lösungen für Zymographie.....	36
3.1.4.3 Lösungen für RNA-Isolation und Gele.....	37
3.1.5 $\beta$ 1-AR-transgene Myokardproben.....	39
3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Picro-Sirius-Rot-Kollagenfärbung.....	40
3.2.1.1 Theoretische Grundlagen.....	40
3.2.1.2 Durchführung der Sirius-Rot-Färbung.....	40
3.2.1.3 Auswertung.....	41
3.2.2 Probengewinnung für Zymographien und Westernblot-Analyse.....	42
3.2.2.1 Präparation des Gesamthomogenats.....	42
3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry.....	42
3.2.3 Westernblot-Analyse.....	43
3.2.3.1 Sodium-(Natrium)-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.2.3.2 Immunoblotting.....	44
3.2.3.3 Auswertung.....	46

<b>3.2.4 Zymographisches Aktivitäts-in-vitro-Assay (Zymographie).....</b>	<b>46</b>
3.2.4.1 Prinzip der Zymographie.....	46
3.2.4.2 Aufkonzentrierung der Proben.....	47
3.2.4.3 Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese.....	47
3.2.4.4 Auswertung.....	48
<b>3.2.5 Analyse der mRNA-Expression.....</b>	<b>49</b>
3.2.5.1 RNA-Isolation aus Myokardproben und RNA-Gelelektrophorese.....	49
3.2.5.2 DNase-Verdau.....	50
3.2.5.3 Reverse Transkription.....	51
3.2.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)....	51
3.2.5.4.1 PCR allgemein.....	51
3.2.5.4.2 TaqDNA-Gold-Polymerase.....	52
3.2.5.4.3 TaqMan-quantitative RT-PCR und Dateninterpretation.....	52
3.2.5.4.3.1 SYBR Green 1 Assay und Passive Referenz (ROX).....	55
3.2.5.4.3.2 Oligonukleotid-Primer und Optimierung der Primerkonzentrationen ....	56
3.2.5.4.3.3 Reaktionsbedingungen .....	56
3.2.5.4.3.4 Vermeidung unspezifischer Produktbildung.....	57
3.2.5.4.4 Auswertung.....	59
<b>3.3 Auswertung.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3.1 Densitometrien und Fotografien.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3.2 Statistik.....</b>	<b>60</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Fibrose: Überexpression des <math>\beta</math>1-adrenergen Rezeptors bedingt</b>	
<b>Veränderungen des myokardialen Kollagengehaltes.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.1 Erfassung der Gesamtkollagen-Expression durch Picro-Sirius-Rot-</b>	
<b>Färbung.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.2 Polarisationsmikroskopischer Nachweis der Kollagentypen I und III ...</b>	<b>64</b>
<b>4.1.3 Regulation der Pro-Kollagen-Typ I und -Typ III mRNA-Expression .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2 Gelatinasen: Einfluss des <math>\beta</math>1-adrenergen Rezeptors auf die Expression</b>	
<b>und Aktivierung der Gelatinasen.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2.1 Regulation der MMP-2 (Gelatinase A) im linksventrikulären Gewebe</b>	
<b><math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>68</b>
4.2.1.1 Zymographische MMP-2-Enzymaktivität.....	68
4.2.1.2 proMMP-2-mRNA-Expression.....	70
<b>4.2.2 Regulation der MMP-9 (Gelatinase B) im linksventrikulären Gewebe</b>	
<b><math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>72</b>
4.2.2.1 MMP-9-Proteinexpression.....	72
4.2.2.2 pro-MMP-9-mRNA-Expression.....	73

<b>4.3 Kollagenasen: Einfluss des <math>\beta</math>1-adrenergen Rezeptors auf die Expression und Aktivierung der Kollagenasen.....</b>	<b>74</b>
<b>4.3.1 Regulation der MMP-13 im linksventrikulären Gewebe <math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>74</b>
4.3.1.1 MMP-13-Proteinexpression .....	74
4.3.1.2 proMMP-13-mRNA-Expression .....	76
<b>4.3.2 Regulation der MMP-1-Proteinexpression und -Enzymaktivität (Interstitielle Kollagenase) im linksventrikulären Gewebe <math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>76</b>
 <b>4.4 Regulation der MT1-MMP (Membrane type-1 matrix metalloproteinase, MMP-14) im linksventrikulären Gewebe <math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>78</b>
4.4.1 MT1-MMP-Proteinexpression .....	78
4.4.2 MT1-MMP-mRNA-Expression.....	80
 <b>4.5 Regulation der TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases).....</b>	<b>81</b>
<b>4.5.1 Regulation von TIMP-1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1) im linksventrikulären Gewebe <math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse .....</b>	<b>81</b>
4.5.1.1 TIMP-1-Proteinexpression.....	82
4.5.1.2 TIMP-1-mRNA-Expression.....	83
<b>4.5.2 Regulation von TIMP-2 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2) im linksventrikulären Gewebe <math>\beta</math>1-AR-transgener Mäuse.....</b>	<b>85</b>
4.5.2.1 TIMP-2-Proteinexpression.....	85
4.5.2.2 TIMP-2-mRNA-Expression .....	87
 <b>5. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
 5.1 Neuroendokrine Aktivierung und interstitielles Remodelling .....	88
5.2 Gelatinasen.....	92
5.2.1 MMP-2-Aktivierung mittels MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2-Tertiärkomplexes .....	92
5.2.2 Regulation der MMP-9 (Gelatinase B).....	95
5.3 Kollagenasen .....	97
5.3.1 MMP-1 (Interstitielle Kollagenase).....	97
5.3.2 MMP-13 (Kollagenase 3).....	98
5.4 TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases).....	99
5.4.1 TIMP-1.....	99
5.5 Modulation der MMP-Aktivität verändert das Fortschreiten der Herzinsuffizienz.....	100
 <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>

<b>7. Vorabveröffentlichungen</b>	<b>119</b>
-----------------------------------	------------

<b>8. Danksagungen</b>	<b>120</b>
------------------------	------------

<b>9. Lebenslauf</b>	<b>121</b>
----------------------	------------

## **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:**

**Abb.** Abbildung

**AC** Adenylatzyklase

**$\alpha$  MHC** alpha-Myosin-Heavy-Chain

**ACE** Angiotensin Converting Enzyme

**AmpliTaQGold DNA-Polymerase** chemisch modifizierte Form  
der AmpliTaq®DNA-Polymerase

**ANP** Atriales Natriuretisches Peptid

**APS** Ammoniumpersulfat

**Aqua dest.** Aqua destillata

**AT1-Rezeptor** Angiotensin Rezeptor Subtyp 1

**ATP** Adenosintriphosphat

**$\beta$ 1AR,  $\beta$ 2AR**  $\beta$ 1-Adrenorezeptor,  $\beta$ 2-Adrenorezeptor

**$\beta$ ARK**  $\beta$ -Adrenozeptorkinase

**$\beta$ 1-AR-TG,  $\beta$ 1-TG**  $\beta$ 1-Adrenorezeptor-transgen

**BFGF** basic fibroblast growth factor

**BNP** brain natriuretic peptide

**bp** Basenpaar

**bzw.** beziehungsweise

**ca.** circa

**cAMP** zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat

**°C** Grad Celsius

**cDNA** komplementäre DNA

**Ct** threshold cycle (Cycle number/Threshold)

**DEPC** Diethylpyrocarbonat

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**DNase** Endonuklease, baut doppelsträngige DNA ab

**dNTP-Mix** Nukleotid-Mix, Desoxyribonukleotide

**dUTP** desoxyribo-Uracil-5'-Triphosphat

**dsDNA** Doppelstrang-DNA

**DTT** Dithiorethiol

**dV/dP** myokardiale Compliance

**ECL** Westernblot Detektionsreagenz

**EF** Ejektionsfraktion

**ECM** Extrazelluläre Matrix

**EGF** epidermal growth factor

**EMMPRIN** Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer

**EDTA** Ethylenediaminetetraacetic Acid

**FVB/N** Mäusestamm FVB/N

**g, mg, µg, pg** Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Picogramm

**GAPDH** Glycerinaldehyd-3'Phosphat- Dehydrogenase

**Ggf.** gegebenenfalls

**Gi** inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein

**Gs** stimulierendes Guaninnukleotid-bindendes Protein

**h** Stunde(n)

**HT1080** humane Fibrosarkom-Zelllinie

**IgG** Immunglobulin G

**ILK** integrin-linked kinase

**IOD-Wert/OD** integrated optical density/optical density

**kDa** Kilo-Dalton

**l, ml, µl** Liter, Milliliter, Mikroliter

**LV** linksventrikulär



**3m, 5m, 12m** 3, 5, 12 Monate alt

**mm, nm** Millimeter, Nanometer

**mA** Milli-Ampère

**M-Cholinozeptoren** muskarinerge Cholinozeptoren

**Mcol-A** murine Kollagenase A

**M** molar

**min** Minute(n)

**mmHg** Millimeter Quecksilbersäule

**MMP** Matrix Metalloproteinase

**MMP-C1** MMP-Standard

**Mol, mmol, µmol, nmol** Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol

**MOPS-Puffer** Morpholinopropane sulfonic acid

**mRNA** messenger Ribonukleinsäure

**MT-MMPs** Membrane -Type MMPs

**MW** arithmetischer Mittelwert

**MW-Standards** Molecular Weight Standards

**n** Anzahl der Experimente

**NA** Noradrenalin

**NHE1** Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauscher

**NYHA** New York Heart Association (NYHA-Klassifikation)

**NTC** no template control

**p** p-Wert

**PBS** phosphatgepufferte Kochsalzlösung

**PDGF** platelet derived growth factor

**pH** negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

**ProMMPs** latente Form der MMPs, Zymogen

**PKA** Protein Kinase A

**RAS** Renin-Angiotensin-System

**RGD-Protein-Sequenzen** Arg- Gly- Asp

**Rn** interne Referenz

**dRn** Fluoreszenzsignal der gesuchten Sequenz geteilt durch das Fluoreszenzsignal eines internen Referenzfarbstoffes

**RNA** Ribonukleinsäure

**tRNA, snRNA, rRNA** Transfer RNA, small nuclear RNA, ribosomale RNA

**RNAse** RNA-abbauende Endonuklease

**ROX** Referenzfarbstoff

**rpm** Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

**RT** Raumtemperatur

**qRT-PCR** Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

**s, ms** Sekunden, Millisekunden

**SR** sarkoplasmatisches Retikulum

**SDS** Dodecylsulfat Na-Salz

**SDS-PAGE** Sodium-(Natrium)dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**SEM** mittlerer Fehler des Mittelwertes (standard error of the mean)

**SERCA** Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

**Sog.** sogenannt(e)(s)

**SYBR-Green I Dye** DNA-bindender Fluorochrom

**Tab.** Tabelle

**TaqDNA-Polymerase** Thermus-aquaticus DNA Polymerase

**TEMED** N',N',N',N'-Tetramethyldiamin

**TG** transgen

**TGF-β** Transforming growth factor-β

**TIMP** Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases

**Tm** Schmelztemperatur

**TNFα** Tumornekrosefaktor alpha

**Tris** Tris(hydroxymethyl)Aminomethan

**U** units-Einheiten

**u.a.** unter anderem

**UV-Licht** Ultraviolettes Licht

**UTP** Uracil-5'-Triphosphat

**V, mV** Volt, Millivolt

**vs.** versus

**v/v** Volumen/Volumen

**w/v** Gewicht/Volumen

**WHO** World Health Organization

**WT** Wildtyp

**z.B.** zum Beispiel

**z.T.** zum Teil

## 1. Zusammenfassung

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation trägt wesentlich zur Entstehung einer linksventrikulären Dysfunktion bei. Der Einfluß der  $\beta$ 1-adrenergen Signaltransduktion auf die Matrix degradierenden Enzyme (Matrix Metalloproteinasen, MMPs) und deren Inhibitoren ("tissue inhibitors of matrix metalloproteinases", TIMPs), die maßgeblich am extrazellulären Matrix Remodelling beteiligt sind, ist nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht das interstitielle Remodelling beim Übergang von der Myokardhypertrophie zum dilatativen kardiomyopathischen Phänotyp an Mäusen mit myokardialer Überexpression des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors. Das Mausmodell wurde durch Ligation des humanen  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors an den murinen  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ MHC)-Promotor generiert. Die Überexpression führt nach 4-5 Monaten zu einer Myokardhypertrophie und zu progredienter linksventrikulärer Fibrose. Nach einer funktionell hyperkontraktilen Phase entwickeln die Tiere eine klinisch manifeste Herzinsuffizienz im Alter von 9-12 Monaten (Ejektionsfraktion 20%).

Myokardhomogenat und mRNA des linken Ventrikels von  $\beta$ 1-Adrenozeptor transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen (FVB/N-Stamm) werden im Alter von 3 Monaten, 5 Monaten und 12 Monaten untersucht. Mit spezifischen Antikörpern (Western blotting) und mRNA spezifischen Primern (Quantitative Real-time PCR) wird die Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, der transmembranären MMP MT1-MMP, der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 und der endogenen Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2) gemessen. Die Gelatinasen-Aktivität wird in der Zymographie untersucht. Die Quantifizierung des Kollagengehaltes erfolgt an Picro-Sirius-Rot-gefärbten Myokardschnitten.

Der Übergang von Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz geht mit einer vermehrten interstitiellen Kollagensynthese einher. Der Übergang von Hypertrophie zu dekompensierter Ventrikeldilatation durch chronische  $\beta$ 1-adrenerge Stimulation ist

charakterisiert durch Ersatzfibrose und Instabilität des Kollagengrundgerüsts. Die Protein- und mRNA-Expression der MMP-2, der MT-1-MMP und von TIMP-2 ist bei den  $\beta$ 1-transgenen Tieren beim Übergang von Hypertrophie zur Herzinsuffizienz signifikant gesteigert. Bei den herzinsuffizienten transgenen Mäusen ist im Alter von 12 Monaten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zusätzlich eine solide Aktivierung der MMP-2 mittels des MT1-MMP-TIMP-2-Komplexes nachzuweisen. Die Transkription der Kollagen-Typ I abbauenden Kollagenasen MMP-13 und MMP-1 wird nicht reguliert. Die zwei Kollagenasen erfahren eine verstärkte Expression des Proenzym im hypertrophen Myokard, aber keine bedeutende Enzymaktivierung. Eine geringe MMP-1-Aktivität in den  $\beta$ 1-transgenen herzinsuffizienten 12 Monate alten Mäusen bewirkt keinen effektiven Kollagenabbau. Die Expression von TIMP-1, dem Inhibitor der Kollagenasen, wird dagegen altersabhängig gesteigert im Sinne einer verminderten Kollagendegradation infolge Hemmung der Kollagenasen. Dies führt zur ventrikulären Compliance-Störung mit beeinträchtigter Herzfunktion.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass chronische  $\beta$ 1-adrenerge Stimulation zur MMP-2-Gelatinasen-Aktivität führt, und dass eine Aktivierung der MMP-2 mit Ersatzfibrose und ventrikulärer Dilatation einhergeht und zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz beiträgt. Das Wissen der selektiven Induktion von MMPs innerhalb des Myokards könnte eine spezielle Relevanz haben für künftige therapeutische Ansätze hinsichtlich der Prävention des Fortschreitens einer chronischen Herzinsuffizienz.

## 1. Summary

### --- Interstitial remodelling in cardiomyopathy induced by $\beta$ 1-adrenergic receptor overexpression ---

Chronic  $\beta$ 1-adrenergic receptor activation contributes to left ventricular cardiac dysfunction. The influence of  $\beta$ 1-adrenergic signal transduction on collagen degrading matrix metalloproteinase activity (MMPs, matrix metalloproteinases) and their inhibitors (TIMPs, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) playing the most important role in extracellular matrix remodelling, is yet unknown. This study investigates the role of interstitial remodelling during transition from hypertrophy to heart failure in transgenic mice overexpressing cardiac  $\beta$ 1-adrenergic receptors. The transgenic mice were generated by placing the coding sequence of the human  $\beta$ 1-adrenergic receptor under the control of the  $\alpha$ -myosin heavy chain promoter. Overexpression of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor leads to marked myocardial hypertrophy and progressive left ventricular myocardial fibrosis in 4-5 months-old mice. The transgenic animals show an increased contractility at a young age and develop evident heart failure at the age of 9-12 months (ejection fraction 20%).

Left ventricular homogenates and -mRNA of cardiac  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice are examined at the age of 3 months, 5 months and 12 months compared to wild type (FVB/N) mice. The expression of gelatinases MMP-2 and MMP-9, membrane-type MMP (MT1-MMP), of collagenases MMP-1 and MMP-13 and TIMPs (TIMP-1 and TIMP-2) is measured with specific antibodies (Western blotting) and mRNA specific primers (real-time PCR). Gelatinase activity is measured with zymographic activity assays. Picrosirius red staining is performed for collagen content.

Transition from hypertrophy to heart failure is associated with increased collagen synthesis and myocardial fibrosis. Transition from hypertrophy to left ventricular dilation caused by overexpression of cardiac  $\beta$ 1-adrenergic receptors is characterized

by myocardial fibrosis and instability of collagen network. Total protein and mRNA-expression of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 significantly increase in the  $\beta$ 1-adrenoreceptor-transgenic group during transition from hypertrophy to ventricular dilation. Maximal activity of the gelatinase MMP-2 is observed in 12 months old  $\beta$ 1-adrenoreceptor-transgenic mice with severe heart failure. It is accompanied by co expression of MT1-MMP and TIMP-2. RNA expression of collagen-type-I-degrading collagenases MMP-13 and MMP-1 determined by real-time PCR is not different between all groups. The latent isoform of the two collagenases increases in  $\beta$ 1-adrenoreceptor transgenic mice at 5 months of age, but without getting activated. In spite of a small amount of active MMP-1 in 12 months-old  $\beta$ 1-adrenoreceptor transgenic mice, there is no effective collagen degradation. Protein expression of TIMP-1, the main inhibitor of the collagenases, increases in both, with aging in the wildtype groups and with disease progression in the  $\beta$ 1-adrenoreceptor transgenic groups, decreasing collagen degradation and thus contributing to impaired ventricular compliance and cardiac function.

In conclusion the presented data provide evidence that chronic  $\beta$ 1-adrenergic receptor activity is responsible for activation of MMP-2 and that activation of MMP-2 is associated with myocardial fibrosis and left ventricular dilation thus leading to progressive heart failure. The knowledge of the selective induction of MMPs within the myocardium might have particular relevance in future therapeutic strategies to prevent progression of chronic heart failure disease.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Epidemiologie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz**

Das Syndrom Herzinsuffizienz stellt die Unfähigkeit des Herzens dar, die Körperperipherie mit ausreichend Blut und daher mit Sauerstoff und Substraten bedarfsgerecht zu versorgen. Ursächlich muss eine ventrikuläre Funktionsstörung zugrunde liegen (WHO, 1995). Die chronische Herzinsuffizienz ist die häufigste internistische Diagnose in den westlichen Industrieländern. Mehr als 2 Millionen neue Fälle werden jedes Jahr weltweit diagnostiziert. Die Inzidenz in Deutschland beträgt zwischen 50000 und 90000 pro Jahr, die Prävalenz zwischen 250000 und 450000 (Willich et al., 2005). Die symptomatische Herzinsuffizienz ist mit einer 5-Jahres-Mortalität von 50 % (Sharpe et al., 1998; Kannel et al., 1972) und selbst unter optimaler Therapie (Betablocker, ACE-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonisten und Aldosteron-Antagonisten) mit einer jährlichen Mortalität von 20-50% im Endstadium ein äußerst malignes und volkswirtschaftlich bedeutendes Syndrom (Lloyd-Jones et al., 2002; Willich et al., 2005). Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter überproportional an, so dass in Zukunft infolge des stetigen Anstiegs der Lebenserwartung sowie durch eine bessere Behandlung akuter Koronarsyndrome mit einer weiteren Zunahme herzinsuffizienter Patienten zu rechnen ist (Kannel et al., 1991). Zur gleichen Zeit werden dank des besseren Verständnisses der pathophysiologischen Prozesse neuere Behandlungsstrategien entwickelt. In den letzten Jahrzehnten konnten gerade durch den Einsatz von ACE-Hemmern und  $\beta$ -Blockern beachtliche Erfolge erzielt werden.

Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz können die koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkte, hämodynamische Belastung durch Herzvitien oder arterielle Hypertonie sowie entzündliche Herzerkrankungen mit Schädigungen des Myokards durch toxische oder pharmakologische Beeinflussung sein. Die Herzinsuffizienz als Endstufe des kardiovaskulären Kontinuums ist damit die gemeinsame Endstrecke



vieler kardiologischer Erkrankungen (Laufs und Erdmann, 1999). Zu den Risikofaktoren, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, zählen neben einem erhöhten Blutdruck und Zeichen einer ventrikulären Hypertrophie u.a. eine verminderte Glukosetoleranz, erhöhte Plasma-Cholesterin-Spiegel, Übergewicht, Rauchen und eine erhöhte Herzfrequenz (Kannel et al., 1988, Eriksson et al., 1989). Durch die Framingham Studie konnte gezeigt werden, dass eine arterielle Hypertonie in 75% der Fälle als zugrundeliegende Veränderung einer chronischen Herzinsuffizienz angesehen werden kann (Kannel et al., 1991; Levy et al., 1996). Aber auch Symptome wie Kurzatmigkeit und Ödembildung, eine verminderte Belastungstoleranz (Cohn et al., 1993; Parameshwar et al., 1992), eingeschränkte Nierenfunktion und erhöhte Plasmakonzentrationen der Hormone Noradrenalin, Renin, ANP (atrialess natriuretisches Peptid) und BNP (“brain natriuretic peptide“) zählen zu Markern bei Herzinsuffizienz, die eine ungünstige Prognose anzeigen. Die Prognose ist ferner abhängig vom Alter und bestehenden Risikofaktoren. Je älter ein Patient zu Beginn der Erkrankung ist, desto ungünstiger ist seine Prognose. Die zuverlässigsten Prognosefaktoren einer Herzinsuffizienz sind die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, ventrikuläre Volumina und der Füllungsdruck (Parameshwar et al., 1992; White et al., 1987). Diese Faktoren sind Ausdruck myokardialer Umbauprozesse, des sogenannten “ventrikulären Remodelling“, welche zur Gefüge-Dilatation des linken Ventrikels führen. Auf mikroskopischem Niveau ist das sog. linksventrikuläre Remodelling mit Umbauvorgängen der Kardiomyozyten und der extrazellulären Matrix (ECM) assoziiert.

Die Mechanismen, die die Progression vom Stadium der kompensierten Myokardhypertrophie zur manifesten Myokardinsuffizienz bewirken oder beschleunigen, sind nur unzulänglich bekannt. Als mögliche Mechanismen werden mechanische Belastung in Form von Vor- und Nachlasterhöhung des Herzens, eine erhöhte sympathische Aktivierung und eine chronische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems diskutiert. Es ist bekannt, dass diese Mechanismen auf zellulärer Ebene verschiedene Veränderungen induzieren können, u.a. eine Desensibilisierung des  $\beta$ -Adrenozeptorsystems (Bristow et al., 1991; Brodde et al., 1991; Böhm et al.,

1988), Veränderungen der intrazellulären Kalziumhomöostase (Gwathmey et al., 1987; Dhalla et al., 1982) und eine Zunahme der Myokardfibrose (Weber et al., 1992), die für die manifeste Herzinsuffizienz charakteristisch sind. Treten diese Veränderungen bereits im Stadium der kompensierten Myokardhypertrophie auf, so sind sie möglicherweise daran beteiligt die Progression zur manifesten Myokardinsuffizienz zu beeinflussen oder gar zu beschleunigen. Die myokardiale Fibrose als ein Kennzeichen vieler kardiovaskulärer Erkrankungen ist beispielsweise ein wichtiger pathophysiologischer Faktor der zur diastolischen Dysfunktion mit Hypertrophie und “Alterung” des Herzens führt (Hess et al., 1981). Ein Anstieg der Bindegewebskonzentration führt zur myokardialen Steifigkeit und resultiert in einer verminderten linksventrikulären Compliance mit diastolischer Dysfunktion (Conrad et al., 1995; Covell et al., 1990; Weber et al., 1994).

## **2.2 Neuroendokrine Aktivierung als Kompensationsmechanismus bei der chronischen Herzinsuffizienz**

Der Organismus reagiert auf die verminderte Pumpleistung mit kardialen Adaptationsmechanismen wie z.B. der Hypertrophie des Myokards sowie mit einer verstärkten neuroendokrinen Aktivierung. Bei länger anhaltender und verstärkter neuroendokriner Aktivierung ergeben sich negative Auswirkungen auf das Myokard hinsichtlich einer linksventrikulären Nachlasterrhöhung und einer Steigerung des Sauerstoffverbrauches, was schließlich zu einer Kontraktilitätsabnahme führt. Folge der weiteren Abnahme der kardialen Funktion ist eine stärkere Stimulation der neuroendokrinen Kompensationsmechanismen und so der Eintritt in einen Circulus vitiosus. Diese Dysregulation leistet einen wesentlichen Beitrag zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz (Cohn et al., 1989). Insbesondere sind drei neuroendokrine Systeme herauszustellen, die sich zum Teil gegenseitig bedingen oder beeinflussen: das sympathische Nervensystem, das zirkulierende und gewebeständige Renin-Angiotensin-System (RAS) sowie eine Freisetzung von natriuretischen Peptiden (ANP und BNP).

Eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems zeigt sich in erhöhten Konzentrationen von zirkulierenden Katecholaminen und einer Entleerung kardialer Katecholaminspeicher (Goldstein et al., 1983; Goldstein und Kopin, 1990). Katecholamine wirken am Herzen positiv inotrop, chronotrop und bathmotrop und führen zu einer peripheren Vasokonstriktion. Bei längerem Bestehen führt die erhöhte Sympathikusaktivierung über eine Abnahme der  $\beta$ -Rezeptorendichte und einer Zunahme von inhibitorischen Guaninnukleotid-bindenden Proteinen zu einer Desensibilisierung des  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktionsweges (Hausdorf et al., 1990). Eine linksventrikuläre Nachlastserhöhung und der erhöhte Sauerstoffverbrauch des Herzens in Kombination mit der  $\beta$ -adrenergen Desensibilisierung führen zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität und chronisch zu einer Progression der linksventrikulären Dysfunktion. Eine myokardiale Wandspannungserhöhung führt zur Aktivierung des lokalen kardialen Renin-Angiotensin-Systems. Angiotensin II trägt als hochwirksamer Vasokonstriktor einerseits zu einer starken Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands bei, andererseits interagiert es mit dem sympathischen Nervensystem und bewirkt eine erhöhte Noradrenalinfreisetzung aus sympathischen Ganglien und Nervenendigungen (Reid et al., 1992) und dem Nebennierenmark. Gleichzeitig wird die Wiederaufnahme von Noradrenalin in die Nervenzellen durch eine RAS-Aktivierung gehemmt (Starke et al., 1971). Für die Sympathikusaktivität konnte gezeigt werden, dass sie direkt proportional zur klinischen Symptomatik und zur Sterblichkeit ist (Cohn et al., 1990).

Mit zunehmender Herzinsuffizienz steigt der Spiegel an natriuretischen Peptiden (ANF und BNP). Die Messung des zirkulierenden BNP hat sich inzwischen als ein sehr sensibler und spezifischer Test zur Diagnose einer Herzinsuffizienz (Berkowitz et al., 2004; Latour-Perez et al., 2005; Sullivan et al., 2005) und zur Abschätzung der Prognose erwiesen (Li et al., 2005; Jarai et al., 2005). Eine medikamentöse Therapie mit Diuretika, ACE-Hemmer, AT1-Rezeptor-Antagonisten, Betablocker und Aldosteronantagonisten senkt jeweils die BNP-Konzentration (Sanderson et al., 1995; van Veldhuisen et al., 1998; Murdoch et al., 1999; Tsutamoto et al., 2001;

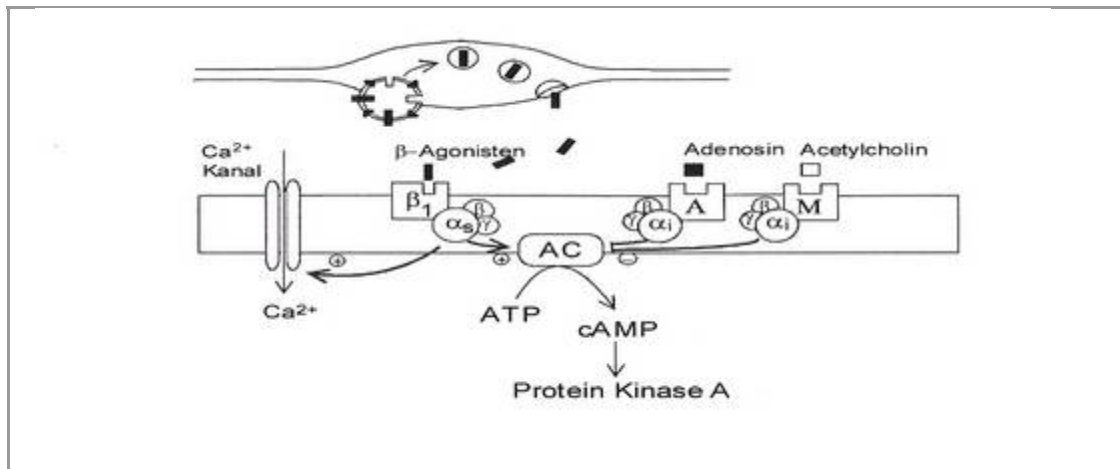
Latini et al., 2002). Durch direkten Einfluss auf myokardiale Fibroblasten und durch Interaktionen mit weiteren Zytokinen und biologisch aktiven Peptiden wie TNF $\alpha$  und Endothelin scheint BNP auch selbst am myokardialen Remodelling beteiligt zu sein (Spinale et al., 2002; Tsuruda et al., 2002).

## **2. 2. 1 Das $\beta$ -adrenerge System**

Die Kontraktilität des Herzens hängt vor allem von der Regulation der freien intrazellulären Kalziumionen-Konzentration ab. Schnelle Wechsel zwischen hohen und niedrigen freien Kalziumkonzentrationen (0,2 - 2  $\mu\text{mol/l}$ ) ermöglichen das zyklische Aufeinanderfolgen von Kontraktion und Relaxation. Die intrazelluläre Kalziumhomöostase wird dabei von verschiedenen kalziumbindenden Proteinen und Transportproteinen beeinflusst und über das  $\beta$ -Adrenozeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-System reguliert.

Nach Stimulation von  $\beta$ -Adrenozeptoren durch Katecholamine koppeln diese mit ihrem intrazellulären Abschnitt an heterotrimere ( $\alpha\beta\gamma$ ) G-Proteine. Die stimulatorische  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert direkt die Adenylatzyklase und führt hierüber zur vermehrten Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).

Durch Stimulation von M-Cholinozeptoren oder Adenosinrezeptoren, welche an inhibitorische G-Proteine ( $G_i$ ) koppeln, kommt es zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (Gilman et al. 1987). Ein Großteil der durch die cAMP-Bildung hervorgerufenen Effekte wird durch Proteinkinasen vermittelt, Enzyme, die die Phosphorylierung von Proteinen des kontraktilen Apparates, des sarkoplasmatischen Retikulums und des sarkolemmalen Kalzium-Kanals katalysieren.



**Abb.1: Signaltransduktion in Kardiomyozyten :**

Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren aktiviert, Stimulation der A1-Adenosin (A) - und Muskarinrezeptoren (M) inhibiert die cAMP Bildung aus ATP über stimulatorische und inhibitorische G-Proteine ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ), die an die Adenylatzyklase (AC) koppeln. cAMP bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase A, die mehrere Proteine der Zellmembran und des sarkoplasmatischen Retikulums, unter anderem Phospholamban, den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  - Kanal und Troponin C, phosphoryliert und damit die Kalzium-Homöostase beeinflusst.

SERCA2a (Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA) ist in der Lage, gegen einen Konzentrationsgradienten cytosolisches Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum zu pumpen, wo es an Calsequestrin gebunden wird. Die Kalziumfreisetzung erfolgt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über einen Kalziumkanal (Ryanodin-Rezeptor). Während der Relaxation findet eine verstärkte Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum statt, wo es an Speicherproteine (Calsequestrin) gebunden wird und für eine erneute Ausschüttung während der Systole zur Verfügung steht.

### 2.2.2 $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion bei chronischer Herzinsuffizienz

Das aus sympathischen Nervenendigungen im Myokard freigesetzte Noradrenalin stimuliert vorwiegend  $\beta_1$ -Adrenozeptoren. Die vermehrte Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Systems führt zu einer Desensibilisierung der Adenylatcyclase des

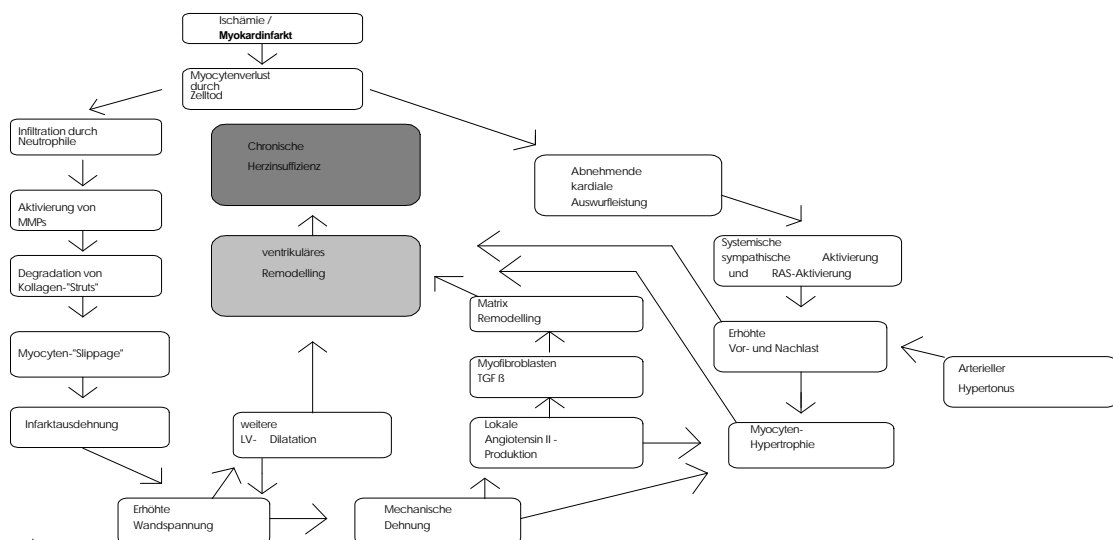
Herzens (Böhm et al., 1988; Bristow et al., 1982; Fowler et al., 1986; Packer et al., 2001). Durch Agonisten-Stimulation kommt es zur Phosphorylierung der Rezeptoren über die  $\beta$ -Adrenozeptorkinase  $\beta$ ARK (Ungerer et al., 1993), welche bei Patienten mit Herzinsuffizienz in Expression und Aktivität im Vergleich zu Gesunden erhöht ist.  $\beta$ ARK phosphoryliert den  $\beta$ -Adrenozeptor, welcher dadurch von der Adenylatcyclase entkoppelt wird (Rezeptordesensibilisierung) und so für den Agonisten (z.B. Noradrenalin) nicht mehr zugänglich ist. Dauert die Exposition des Rezeptors mit zu hohen Noradrenalin - Plasmakonzentrationen länger an erfolgt die Sequestrierung des Rezeptors, es kommt zur sog. "Downregulation der  $\beta$ -Rezeptoren" (Böhm et al., 1988; Bristow et al., 1982; Fowler et al., 1986; Hausdorff et al., 1990). Diese Prozesse sind unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz (Böhm et al., 1995). Weiterhin ist die Expression von  $G_{i\alpha}$  bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht, wodurch ebenfalls eine Verminderung der basalen und  $\beta$ -adrenerg stimulierten Adenylatzyklen-Aktivität hervorgerufen wird. Die funktionelle Relevanz dieser Entwicklung besteht in der verminderten Ansprechbarkeit des Herzens auf Katecholamine sowohl in vitro (Böhm et al., 1990) als auch in vivo (Gage et al., 1986).

Durch die chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation steigt die Herzfrequenz, und somit sinkt durch die damit verbundene verminderte diastolische Füllungszeit der myokardiale Blutfluss. Dies hat einen negativen Einfluss auf den Energiehaushalt des Myokards. Der katecholamininduzierte Anstieg des Calcium-Einstroms führt zu einem hohen Energieverbrauch mit intrazellulärer Azidose und dadurch bedingter Verminderung der oxydativen Phosphorylierung (Schwartz et al., 1968) und Aktivierung von Calcium-abhängigen Proteasen, was letztendlich nachweislich zur Nekrose von Kardiomyozyten führt. Es ist zu beachten, dass ein Anstieg der Herzfrequenz bei einem gesunden Herzen auch zur Steigerung der Kontraktilität führt (Bowditch-Effekt). Diesen Mechanismus erfüllt das insuffiziente Herz jedoch nicht mehr, es kommt sogar zu einer Abnahme der Kontraktilität mit zunehmender Herzfrequenz.

## 2.3 Kardiales Remodelling - morphologische Anpassungsprozesse

Das myokardiale Remodelling ist ein Umbauprozess währenddessen das Myokard seine Geometrie und Funktion ändert als Antwort auf pathologische Faktoren und Stimuli. Im Myokard könnten solche Stimuli Druck- oder Volumenbelastung oder eine Schädigung des Herzens durch Ischämie und Reperfusion sein. Nach einem Myokardinfarkt beispielsweise erfährt das Herz einen strukturellen Schaden, der letztendlich die linksventrikuläre Größe und Form verändert. Der Vorgang der chronischen Umbauprozesse wird als “ventrikuläres Remodelling” bezeichnet. Dieses ventrikuläre Remodelling schreitet ggf. bis hin zur schweren Kardiomyopathie mit Herzversagen fort (Cohn et al., 2000; Sutton und Sharpe, 2000). Herzinsuffizienz ist die führende Ursache für Mortalität und Morbidität in den Industrieländern, und die häufigste Ursache ist das Remodelling nach Myokardinfarkt (Weber et al., 1997). Somit ist das ventrikuläre Remodelling der primäre Angriffspunkt zur Prävention von Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Bisher scheint es so zu sein, dass Therapien, die das Remodelling mindern (wie z.B. die  $\beta$ -adrenerge Blockade oder ACE-Inhibition) letztendlich auch den klinischen Verlauf verbessern. Das hat Untersucher dazu verleitet neue Wege zur Verhinderung progressiver kardialer Dilatation zu finden.

**Abb. 2: Pathophysiologische Wege zum myokardialen Remodelling**



### 2.3.1 Das myokardiale Interstitium

Das Interstitium des Myokards besteht wesentlich aus der extrazellulären Matrix (ECM). Es ist ein fibrilläres Netzwerk aus Kollagen, Basalmembranen, Fibronectin, Proteoglykanen, Laminin, MMPs (Matrix Metalloproteinasen) und Wachstumsfaktoren. Die wichtigste Komponente der ECM ist das fibrilläre Kollagen, welches auch die Hauptkomponente des fibrösen Gewebes ist. Typ I und Typ III sind die Hauptkollagene im Myokard, wobei Typ I vorherrschend im adulten Herzen ist (Weber et al., 1989). Glykosaminoglykane umgeben die fibrilläre Kollagen-Matrix und bilden eine breite hydrierte Matrix, welche als Reservoir für bioaktive Moleküle und Metabolite dient. Mit Hilfe von "Scanning and Transmission Elektron Microscopy" wurde demonstriert, wie die myokardiale Kollagen-Matrix durch ihre 3-dimensionale Struktur einzelne Myocyten stützt (Rossi et al., 1998). Die Kollagen-Matrix liefert somit die notwendige Struktur, um die Ausrichtung und Gruppierung der Myofibrillen innerhalb des Myocyten und wiederum die Ausrichtung der Myocyten innerhalb des Myokards aufrechtzuerhalten (Borg and Burgess, 1993; Factor et al., 1994). Die extrazelluläre Matrix (ECM) hat nicht nur eine passive Funktion, nämlich als Substrat für die Zell-Adhäsion, sondern spielt auch eine aktive Rolle in der Regulation des zellulären Verhaltens. Sie stellt ein dynamisches Umfeld dar, auch unter normalen, anscheinend ruhigen Bedingungen und ist besonders aktiv in der Antwort auf Gewebeschäden. Die ECM steht sowohl mechanisch als auch biochemisch in ständiger Kommunikation mit Zellen und überträgt somit auf effektive Art und Weise "outside-in" zelluläre Signale durch ECM-Rezeptoren wie z.B. die zellmembranständigen Integrine (Liu et al., 2000). Die myokardiale ECM befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau. MMPs sind verantwortlich für den ECM-Abbau und haben somit eine besondere Relevanz im Rahmen der Progression der Herzinsuffizienz.

Nicht-Myocyten machen etwa 2/3 der Zellen im Myokard aus. Das Ausmaß der Nicht-Myocyten im insuffizienten Herzen ist sogar noch höher dank derer Fähigkeit zur Proliferation, wohingegen die Zahl der Kardiomyozyten eher abnimmt (Weber und



Brilla, 1991). Hypertrophie der Kardiomyocyten und Proliferation der Nicht-Myocyten werden durch verschiedene Signal-Systeme induziert. Die Nicht-Myocyten produzieren verschiedene Signalmoleküle, einschließlich Angiotensin II, Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere neurohumorale Peptide, die für parakrine oder autokrine Effekte im Myokard verantwortlich sind. Pathologische Hypertrophie und Remodelling des Myokards im Rahmen der Herzinsuffizienz sind assoziiert mit einer Akkumulation an ECM-Proteinen produziert durch Nicht-Myocyten.

### **2.3.2 Interstitielle Umbauvorgänge durch Matrix Metalloproteinasen und deren Inhibitoren**

In kardialen Gewebe können alle Zelltypen inklusive Myocyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen MMPs produzieren, die basale Expression ist jedoch sehr niedrig. Die MMP-Expression erhöht sich jedoch sofort als Antwort auf mehrere pathologische Bedingungen einschließlich Ischämie und Myokardinfarkt (Cleutjens et al., 1995). Zudem wurde sowohl in Tiermodellen als auch an Menschen gezeigt, dass MMPs im insuffizienten Herzen erhöht sind (Tyagi et al., 1996; Thomas et al., 1998; Li et al., 1998; Li et al., 2000).

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) im Myokard sind fähig alle ECM-Komponenten abzubauen einschließlich fibrilläres Kollagen, Elastin, Fibronectin und Glykosaminoglykane. Sie sind somit die treibende Kraft hinter dem myokardialen Matrix-Remodelling. Jedoch weist das insuffiziente Herz in der Regel trotz erhöhter MMP-Expression einen erhöhten Kollagengehalt auf, was einer gesteigerten De-novo-Kollagen-Synthese zugeschrieben werden kann. Die Induktion der Kollagen-Synthese basiert auf verschiedenen Faktoren einschließlich Wachstumsfaktoren, Angiotensin II, aber auch Matrix-Fragmenten (sog. Matrikine) als Ergebnis des Verdaus von Kollagen durch aktive MMPs.

### 2.3.2.1 Interstitielle Fibrose

Unabhängig von der Ätiologie kulminiert die Herzinsuffizienz in einem Bild von kardialer Fibrose, Dilatation und Kontraktilitätsverlust. Die Fibrose des Herzens ist der pathologische Hauptbefund bei der Untersuchung der systolischen als auch der diastolischen Dysfunktion beim insuffizienten Herzen. Zwei distinkte Typen der kardialen Fibrose wurden identifiziert, reparativ und reaktiv (Weber, 1997). Reparative Fibrose ist das Ergebnis eines Narbenprozesses, in welchem kleine oder große Flächen von Nekrose nach einem direkten Schaden wie Myokardinfarkt heilen (Whittaker, 1995). Reaktive Fibrose ist die fibrogene Antwort des Myokards auf eine Vielzahl von Stimuli einschließlich einer chronischen Erhöhung von Angiotensin II, Mineralokortikoiden und Immunkomplexen. Im ischämischen Herzversagen des Menschen machen beispielsweise multiple Foci von reaktiver Fibrose mehr als zwei Drittel des fibrösen Gewebes aus, während die Infarktnarbe selbst nur ein Drittel ausmacht (Beltrami et al., 1994).

Kardiale Fibrose ist nicht nur als Zunahme der Konzentration von Matrix-Kollagenen im Interstitium definiert, sondern auch durch einen Wechsel im Kollagen-Typ, eine sog. Kollagen-Typ-Verschiebung (Mukherjee and Sen, 1990 und 1991), in der Kollagen-Organisation (Whittaker, 1995; Li et al., 2000), im Kollagen-Cross-linking (Norton et al., 1997; Woodiwiss et al., 2001) und in der Kollagen-Denaturierung (Whittaker, 1995; Li et al., 2000). Verstärkte Kollagenbildung mit einem Wechsel im Verhältnis von Typ I zu Typ III kann als Antwort auf eine Vielzahl von Wachstumssignalen vorkommen. Verschiedene Veränderungen in der Zusammensetzung von Kollagentypen und “cross-links” wurden während der Entwicklung einer kardialen Fibrose in verschiedenen Tiermodellen als auch bei Patienten mit Herzversagen beobachtet (Bishop et al., 1990; Chapman et al., 1990; Mukherjee und Sen, 1991; Weber et al., 1988). Das Verhältnis von Typ I zu Typ III- Kollagen wechselt in verschiedenen Entwicklungsstadien oder unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen. Diese Wechsel führen zu Veränderungen in den mechanischen Eigenschaften des Gewebes. Die myokardiale Compliance ( $dV/dP$ ) ist beispielsweise direkt betroffen sowohl durch die Konzentration als auch durch das Verhältnis der verschiedenen Kollagentypen im Herzen (Mukherjee und

Sen, 1991; Janicki et al., 1993). Eine Zunahme des TypI-Kollagens erhöht die myokardiale Steifigkeit genauso wie eine Zunahme des Kollagen-Cross-Linking, während eine Zunahme an Typ III-Kollagen die myokardiale Compliance sogar verbessern könnte.

**Tab.1: Kollagen-Typen**

Typ	Kollagenmolekül-Zusammensetzung	Gewebeverteilung
I	$\alpha 1(I)$ $2\alpha 2(I)$ Heterotrimer	Herz, Haut, Knochen, Sehnen, Cornea, Lungen, Skleren
II	3 $\alpha 1(II)$ Homotrimer	Knorpel, Glaskörper, Nucleus pulposus
III	3 $\alpha 1(III)$ Homotrimer	Herz, Haut, Blutgefäße, innere Organe etc. (retikuline Fasern)
IV	2 $\alpha 1(IV)$ $\alpha 2(IV)$ Alpha1-alpha6	Basalmembranen
V	$\alpha 1(V)$ $\alpha 2(V)$ $\alpha 3(V)$ Heterotrimer	In den meisten Zwischengeweben häufig zusammen mit Kollagen Typ I
VI	$\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$	Die meisten Zwischengewebe, einschließlich Knorpel
VII	3 $\alpha 1(VII)$	Basalmembranen-verankernde Fibrillen in der Haut
VIII	3 $\alpha 1(VIII)$ $\alpha 2(VIII)$	Endothelzellen
IX	$\alpha 1(IX)$ $\alpha 2(IX)$ $\alpha 3(IX)$	Zusammen mit Kollagen Typ II
X	3 $\alpha 1(X)$	Hypertrophierter und mineralisierender Knorpel
XI	$\alpha 1(XI)$ $\alpha 2(XI)$ $\alpha 3(XI)$	Zusammen mit Kollagen Typ II
XII	3 $\alpha 1(XII)$	Zusammen mit Kollagen Typ I
XIII	3 $\alpha 1(XIII)$	Haut, Darm
XIV	3 $\alpha 1(XIV)$	Zusammen mit Kollagen Typ I

### 2.3.2.2 Familie der Matrix Metalloproteinasen ( MMPs )

MMPs sind Mitglieder einer Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die spezifisch Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen (Nagase und Woessner., 1999; Sternlicht und Werb., 2001). Es sind inzwischen mehr als 30 MMPs kloniert und identifiziert worden, welche alle extrazellulär gelegen sind, hauptsächlich perizellulär, einige sind membrangebunden. MMPs weisen eine Sequenzhomologie auf, was eine Konservierung der Struktur bedingt. Alle MMPs haben ein Signal-Peptid am N-terminalen Ende, welches entfernt wird sofort nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum, und beinhalten zusätzlich ein Propeptid aus ca. 80 Aminosäuren, was abgespalten werden muss, damit die MMP enzymatische Aktivität erreicht. Diese Enzyme haben funktionelle Ähnlichkeiten, z.B. benötigen sie  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum für ihre enzymatische Aktivität, benötigen Calcium für ihre Stabilität, optimalerweise einen neutralen pH-Wert, und sie werden inhibiert durch ihre endogenen Inhibitoren TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Jede der MMPs hat eine distinkte aber sich z.T. oft überlappende Substratspezifität, alle zusammen können sie die meisten wenn nicht alle Proteine der extrazellulären Matrix abbauen. Die Mehrheit dieser Enzyme werden anfänglich als inaktive latente Zymogene (proMMPs) gebildet, die Aktivierung erfolgt durch Propeptidspaltung durch Serin-Proteinasen, wie z.B. Plasmin, aber auch durch andere MMPs oder andere noch nicht bekannte Mechanismen. Eine Minderheit an MMPs haben transmembranäre Domänen und können als Proteasen fungieren, aber auch als Rezeptoren der Zellmembran.

**Tab. 2 : MMPs ( Matrix Metalloproteinasen )**  
**( Auswahl, im Herzen nachgewiesen )**

MMP	Traditional name	Major substrates	Activator	Inhibitors (Beside EDTA)	Inducers	Major cell or tissue distribution
MMP-1	Interstitial Collagenase	Collagen I , II , III , X , gelatin	Plasmin, MMP-3,-7,-10	TIMP-1,-4 Tetrazyklin	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ PDGF, Phorbol	Heart and nearly all tissues
MMP-2	Gelatinase A	Gelatin, Laminin, Collagen I,IV,V,VII, Fibronectin, Elastin	MT1-MMP	TIMP-1,-4 TIMP-2	TGF- $\beta$	ubiquitous
MMP-3	Stromelysin	Proteoglykane, Fibronectin, Gelatine, Kollagen III, IV, V, IX		TIMP-1,-4	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ EGF, Phorbol	Heart Lung Liver
MMP-9	Gelatinase B	Gelatine, Proteoglykane, Collagen IV, V, VII, Fibronectin, Elastin	Plasmin MMP-2	TIMP-1,-4 Tetrazyklin	TGF $\beta$ TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ LPS Phorbol EGF Ischemia Cell-Matrix contact	WBC Osteoclast Trophoblasts
MMP-13	Rodent collagenase	Collagen I,II,III	MT1-MMP		LIF , TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ Phorbol	Widely including heart , post-partum uterine
MMP-14	MT1-MMP	Collagen, Aggrecan, ProMMP-2		TIMP-2,-3	TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ EGF	Lung Kidney Spleen Placenta

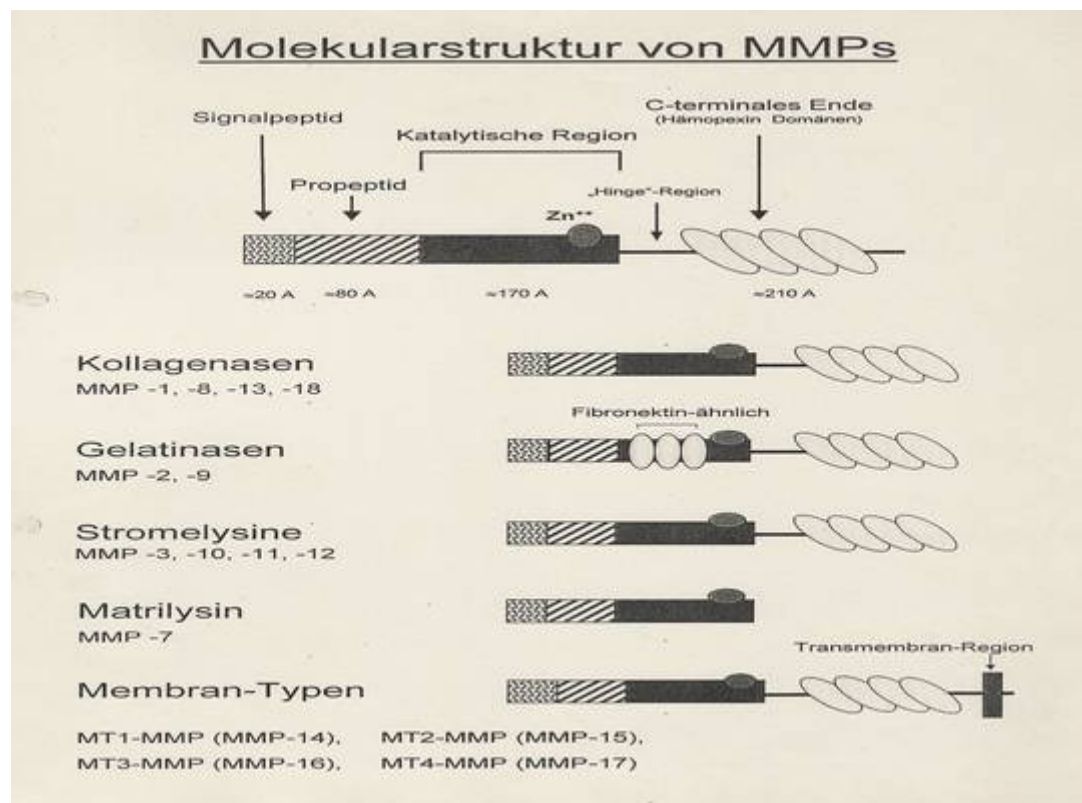
TGF $\beta$  = transforming growth factor  $\beta$   
 TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor  $\alpha$   
 IL-1 $\beta$  = interleukin-1 $\beta$   
 LPS = lipopolysaccharide

EGF = epithelial growth factor  
 PDGF = platelet derived growth factor  
 LIF = leukemia inhibitory factor  
 WBC = white blood cell

Die Gruppe der **Kollagenasen** schließt die MMP-1 ein (Interstitielle Kollagenase), die MMP-8 (neutrophile Kollagenase) und die MMP-13 (Kollagenase-3), welche alle fibrilläres Kollagen der Typen I, II und III spalten können. Diese Kollagen-Sorten sind gegenüber Spaltung durch die meisten anderen Proteinase sehr widerstandsfähig, denn fibrilläre Kollagen-Ketten sind eng aneinander gebunden und in hohem Maße quervernetzt

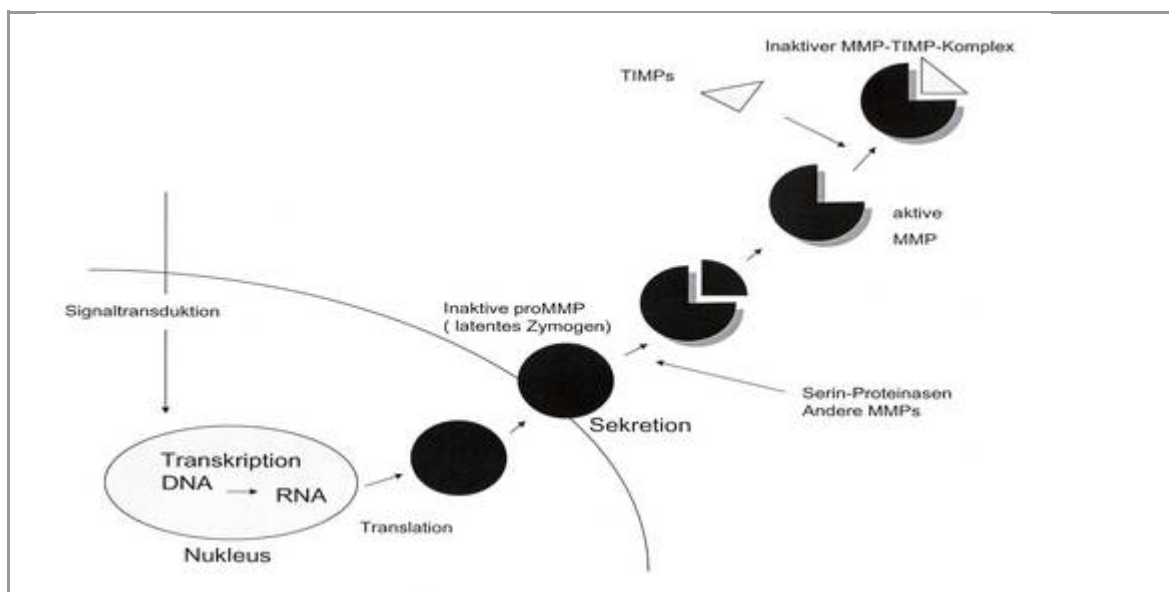
(cross-linked). Kollagenasen spalten fibrilläres Kollagen an definierten Stellen der Trippel-Helix in  $\frac{3}{4}$ -Länge vom N-terminalen Ende aus, wodurch zwei Fragmente entstehen, die daraufhin eine weitere Fragmentation durch Gelatinasen zu Gelatinen erfahren. Die **Gelatinasen** umfassen die MMP-2 (Gelatinase A, 72kDa Gelatinase) und die MMP-9 (Gelatinase B, 92kDa Gelatinase), und bauen Gelatine ab sowie weitere Moleküle, wie z.B. das Typ IV-Kollagen der Basalmembranen (Rolle bei der Metastasierung). Die **MT-MMPs** (Membrane -Type MMPs) bauen nicht nur einige extrazelluläre Matrix-Bestandteile ab, sondern sind auch in der Lage, andere MMPs zu aktivieren.

**Abb. 3 : Molekularstruktur der Matrix Metalloproteinasen**



Das komplette Spektrum an MMPs in vivo ist nur unvollständig definiert und untersucht. Weitere Fortschritte der Proteom-Technologie werden weitere Einsichten liefern in die Vielfalt und Regulation der MMPs.

Die Integrität der extrazellulären Matrix ist bedeutend für die Gewebsstruktur. Somit unterliegt die Aktivität der MMPs einer engen Kontrolle auf verschiedenen Ebenen. Die MMP-Aktivität kann kontrolliert werden bei der Transkription, der Translation, der Sekretion oder auch im Rahmen der Aktivierung der latenten Zymogene zu den aktiven Proteasen. Außerdem können die endogenen Inhibitoren, die sog. TIMPs, die MMP-Aktivität auf schnellstem Wege hemmen.



**Abb. 4: Mehrschrittige Regulation der MMP-Aktivität**

Die Aktivität der MMPs wird auf verschiedenen Ebenen reguliert.

- 1) Intrazelluläre Signaltransduktion
- 2) Regulation der Transkription
- 3) Post-transkriptionelle Regulation
- 4) Sekretion
- 5) Proteolytische Aktivierung
- 6) Inhibition durch Bindung von TIMPs

Einige der MMPs sind membrangebunden, so dass Aktivierung und Inhibition an der Zelloberfläche erfolgen.

Die Expression der meisten MMPs erfolgt im allgemeinen in nur geringem Maße in normalem adulten Gewebe, wird aber während bestimmter physiologischer und pathologischer Remodelling-Prozesse sofort hochreguliert. Eine gesteigerte MMP-



Expression wird gemessen als Antwort auf eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, Interleukin-6, TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha), EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), BFGF (basic fibroblast growth factor) und Angiotensin II (Lee et al., 2001; Mann und Spinale, 1998; Nagase und Woessner, 1999; Sternlicht und Werb, 2001; Sutton und Sharpe, 2000). Verschiedene Faktoren wie z.B. Retinoid-Säure, Heparin, Interleukin-4 und Glukokortikoide können die MMP-Expression supprimieren. Nicht nur lösliche Faktoren, sondern auch Zell-Matrix - und Zell-Zell-Interaktionen regulieren die Gen-Expression der MMPs. So induziert z.B. ein Zelloberflächenprotein aus der Familie der Immunglobuline, EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), die Expression von MMP-1, -2 und -3 (Guo et al., 2000), und durch Aktivierung von Integrinen während Kultivierung auf Typ-I-Kollagen induziert es die MT1-MMP-Expression auf Endothelzellen (Haas et al., 1998) und Fibroblasten (Gilles et al., 1997). Außerdem scheint die Regulation der MMP-Expression Zelltyp-spezifisch zu sein. So erhöht beispielsweise Interferon- $\gamma$  die MMP-1 Expression in Keratinocyten (Tamai et al., 1995), senkt aber gleichzeitig die MMP-1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (Schonbeck et al., 1997).

Eine Aktivierung der Zymogene erfolgt meist durch nicht-spezifische Spaltung der proMMPs durch Serin-Proteasen, wie z.B. Trypsin und Furin (Santavicca et al., 1996; Sato et al., 1996; Sorsa et al., 1997; Duncan et al., 1998; Rao et al., 1999). Die MMP-2 stellt bezüglich des Aktivierungsmechanismus eine Besonderheit dar. Sie ist für eine Aktivierung durch Serin-Proteinasen unzugänglich. Die MMP2-Aktivierung erfolgt an der Zelloberfläche durch einen einzigartigen Mehrstufenaktivierungsweg (mehrschrittige Aktivierung), an dem sowohl MT-MMPs als auch TIMP-2 beteiligt sind (Nagase und Wössner, 1999; Strongin et al., 1993). MT-MMPs sind Membran-gebunden, wodurch eine genaue Kontrolle bezüglich der Lokalisation der MMP-Aktivierung /-Aktivität und folglich auch des Abbaus der extrazellulären Matrix gewährleistet wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen MMPs, die als latente Zymogene sezerniert werden, enthalten die MT-MMPs eine " furin-like"-Enzym-Erkennungstelle zwischen dem Propeptid und der katalytischen Domäne, wodurch sie durch intrazelluläre Serin-Proteinasen im trans-Golgi-

Netzwerk vor der Sekretion aktiviert werden können (Nagase und Woessner, 1999; Pei und Weiss, 1995; Sternlicht und Werb, 2001).

### **2. 3. 2. 3 Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs)**

TIMPs sind eine Klasse von endogenen “low-molecular-weight” Molekülen mit multiplen Funktionen (Baker et al., 1998; Li et al., 1998; Li et al., 1999) einschließlich MMP-Inhibition, anti-Angiogenese (Murphy et al., 1993; Johnson et al., 1994) und Förderung des Zellwachstums (Nemeth et al., 1996). In erster Linie sind sie aber, wie der Name schon sagt, als endogene spezifische Inhibitoren der MMPs (TIMPs genannt) bekannt. Voll aktivierte MMPs werden reversibel inhibiert, indem die TIMPs mit großer Affinität in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 an diese binden (Gomez et al., 1997). Die TIMP-Familie besteht aus vier strukturell miteinander verwandten Mitglieder, TIMP-1, -2, -3 und -4. Sie werden alle mit unterschiedlicher Regulation im Myokard exprimiert (Li et al., 1998). TIMPs werden durch eine Vielfalt von Zell-Typen exprimiert und sind in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten enthalten. Ihre Gen-Regulation und ihr Gewebe-spezifisches Muster der Genexpression variiert jedoch zwischen den einzelnen TIMPs. So induziert z.B.  $\text{TNF}\alpha$  die Expression von TIMP-1, die TIMP-3 -Expression wird jedoch runterreguliert (Ries und Petrides, 1995). Einzelne Mitglieder der TIMPs haben auch einen gewissen Grad an Spezifität gegenüber bestimmten Mitgliedern der MMP-Familie (Murphy and Willenbrock, 1995). Während TIMP-1 die Aktivität der meisten MMPs inhibiert, mit Ausnahme von MMP-2 und MT1-MMP, ist TIMP-2 ein potenter Inhibitor der meisten MMPs einschließlich der MT1-MMP, aber nicht der MMP 9. Obwohl die TIMPs sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten untereinander aufweisen, z.B. mit der Konservierung von 12 Cystein-Resten (wichtig für die Tertiärstruktur), antworten sie unterschiedlich auf pharmakologische und physiologische Stimuli.

TIMP-1 und TIMP-2 binden auch an pro-MMPs und bilden somit proMMP-TIMP-Komplexe. Die funktionelle Signifikanz dieser Pro-MMP-TIMP-Komplexe konnte noch nicht völlig verstanden werden. Zum einen inhibieren die TIMPs die MMP-Aktivierung, zum anderen kann TIMP-2 zusammen mit der MT1-MMP einen Komplex auf der Zellmembran bilden, welcher eine regulatorische Funktion in der proteolytischen Aktivierung der MMP-2 erfüllt (Murphy und Willenbrock 1995; Strongin et al 1995). Es gibt Hinweise, dass die Effekte konzentrationsabhängig sein könnten. Somit ergeben sich multiple biologische Effekte der TIMPs, die abhängig von den Stimuli für das LV-Remodelling relevant sein können.

## 2.4 Fragestellung

Neuere Studien zeigen, dass die extrazelluläre Matrix für die Aufrechterhaltung der Füllungseigenschaften und der kardialen Kontraktilität von großer Bedeutung ist. Über die Bedeutung und Regulation der Matrix Metalloproteinasen, der für den Kollagenabbau wichtigsten Proteinasen, ist hinsichtlich der myokardialen Remodelling-Vorgänge nur wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die stadiengerechte Charakterisierung der Expression und Aktivität der Matrix Metalloproteinasen und deren endogenen Inhibitoren beim Übergang von der kardialen Hypertrophie zur Herzinsuffizienz. Als Modell dienen transgene Mäuse, die den  $\beta$ 1-Adrenozeptor in Kardiomyozyten überexprimieren und aufgrund der chronischen sympathoadrenergen Stimulation ein ideales Modell zur Untersuchung von Faktoren darstellen, die den Übergang von der stabilen Myokardhypertrophie zur Herzinsuffizienz vermitteln. Mechanismen, die über eine Aktivierung von MMP-Isoformen vermittelt werden, könnten eine Bedeutung bei der Progression der linksventrikulären Dysfunktion erlangen. Zusätzlich lässt sich die Art und das Verteilungsmuster der fibrotischen Umbauvorgänge unter sympathischer Stimulation an diesem Modell studieren. Das Verständnis über die stadiengerechte Aktivierung der MMP-Isoformen könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei der Behandlung der Herzinsuffizienz beitragen.

Um die Effekte der kardialen Überexpression des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors auf das interstitielle Remodelling zu erfassen, untersuchen wir Mäuse mit 15-facher myozytärer Überexpression des humanen  $\beta$ 1-Adrenorezeptors kontrolliert durch den  $\alpha$ -Myosin-Heavy-Chain-Promotor der Kardiomyozyten. Die Entwicklung der Herzinsuffizienz in diesem Tiermodell erweist sich als vergleichbar mit der beim Menschen beobachteten kardialen Insuffizienzentwicklung.

Im einzelnen werden die  $\beta$ 1-Adrenozeptor transgenen Mäuse (FVB/N-Stamm) im

Alter von 3 Monaten, 5 Monaten und 12 Monaten untersucht und mit altersentsprechenden Wildtyp-Tieren (FVB/N) verglichen. Dieses transgene Tier-Modell ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Katecholaminen, Veränderungen der basalen Herzfunktion, morphologische Herzhypertrophie im Alter von 5 Monaten, zunehmende extrazelluläre Fibrose und schwere Herzinsuffizienz als Hauptmerkmale der 1-Jahr alten Mäuse mit Ventrikeldilatation. Aufgrund des Versuchsaufbaues ist durch den Vergleich mit altersentsprechenden Wildtyp-Tieren zusätzlich die Betrachtung der physiologischen altersassoziierten Regulation des interstitiellen Remodellings möglich.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Substanzen

Acrylamid, Sigma, Deisenhofen

Agarose Ultrapure Electrophoresis Grade, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Ammoniumpersulfat (APS), Serva, Heidelberg

AmpliTaqGold DNA-Polymerase, PE Applied Biosystems

Ampuva Wasser, Fresenius

Aqua. destillata

$\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma, Deisenhofen

Broad range marker prestained, BioRad, München

Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen

Calciumchlorid, Sigma, Deisenhofen

Chloroform, Merck, Darmstadt

Coomassie Brilliant Blue G-250, BioRad, München

DC protein assay, BioRad, München

Diethylpyrokarbonat (DEPC), Sigma, Deisenhofen

Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Dithiorethiol (DTT), Qiagen, Hilden

DNAse I, Roche, Mannheim

Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), Serva, Heidelberg

Entellan, Merck, Darmstadt

Essigsäure, Merck, Darmstadt

Ethanol, Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Sigma, Deisenhofen

Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), Sigma, Deisenhofen

Filter Papier, BioRad, München

Formaldehyd, Merck, Darmstadt

Formamid, Carl Roth GmbH+Ko, Karlsruhe  
Gelatine Typ B, Sigma, Deisenhofen  
Glukose, Sigma, Deisenhofen  
Glyzerol, Sigma, Deisenhofen  
Glyzin, Sigma, Deisenhofen  
Größe Objektträger: 76 x 26 mm (beschnitten/mattrand) (Menzel-Gläser)  
Größe Deckgläser: 24 x 60 mm (Menzel-Gläser)  
High Molecular Weight Marker, Sigma, Deisenhofen  
HT-1080 Überstand  
Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
Isopropanol, Merck, Darmstadt  
Kaliumchlorid, Sigma, Deisenhofen  
Kaliumdihydrogenphosphat, Sigma, Deisenhofen  
Kaliumhydroxid, Sigma, Deisenhofen  
Kakodylsäure, Sigma, Deisenhofen  
Low Molecular Weight Marker, Sigma, Deisenhofen  
Methanol, Roth, Karlsruhe  
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, PE Applied Biosystems  
MMP-Kontrolle1, Sigma, Deisenhofen  
Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), Merck, Darmstadt  
Natriumacetat, Merck, Darmstadt  
Natriumazid, Sigma, Deisenhofen  
Natriumbicarbonat, Sigma, Deisenhofen  
Natriumchlorid, Sigma, Deisenhofen  
Natriumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt  
Paraffin  
PeqGOLD RNAPure, Peqlab, Erlangen  
Picro-Sirius-Red F3BA  
Ponceau S Solution, Serva, Heidelberg  
Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schüll, Dassel

Random Primer Hexamers, Roche, Mannheim

RNA Clean, AGS GmbH, Heidelberg

RNAse A, Sigma, Deisenhofen

RNAse-Inhibitor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Salzsäure, Merck, Darmstadt

Sensiscript II Reverse Transcriptase, Qiagen, Hilden

Sensiscript RT Kit, Qiagen, Hilden

Succrose, Sigma, Deisenhofen

SYBR Green PCR Master Mix, PE Applied Biosystems, Weiterstadt

N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), Sigma, Deisenhofen

Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS), Sigma, Deisenhofen

Triton X-100, Sigma, Deisenhofen

Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate), Sigma, Deisenhofen

Western Blocking Reagent, Roche, Mannheim

Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Xylene-Cyanol, Sigma, Deisenhofen

Xylol, Merck, Darmstadt

Zentrikons YM-10, Millipore, Bedford, USA

Ziegenserum, Sigma, Deisenhofen

Zinkdichlorid, Sigma, Deisenhofen

Es kommt ausschließlich deionisiertes und bidestilliertes Wasser zur Anwendung.



### 3.1.2 Antikörper für Westernblot -Analyse

**Tab. 3: Primärantikörper**

Name	MMP-1 (AB-1)	MMP-9 (AB-2)	MMP-13 (AB-7)	MT1-MMP (AB-4)	TIMP-1 (AB-1)	TIMP-2 ( AB-1 )	Calsequestrin
<b>latent</b>	57/52 kDa	92 kDa	60 kDa	66 kDa	28 kDa (Komplex)	21/ 24 kDa	55 kDa
<b>aktiv</b>	46/42 kDa	83 kDa	48 kDa	56 kDa			
<b>2.Antikörper</b>	Goat-anti-mouse	Goat-anti-mouse	Goat-anti-mouse	Goat-anti-mouse	Goat-anti-mouse	Goat-anti-mouse	Goat-anti-rabbit
<b>Species</b>	Human ( rat , mouse ND )	Human, mouse	Rat , mouse	Human , mouse, rat , rabbit	Human , mouse	Human , mouse	Human , mouse , rat u.a.
<b>Origin</b>	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse	Rabbit
<b>Clone</b>	41-1E5	7-11C	LIPCO IID1	113-5B7	7-6 C1	T2-101	
<b>Firma</b>	Calbiochem	Calbiochem	Calbiochem	Calbiochem	Calbiochem	Calbiochem	Dianova
<b>Cat#</b>	IM 35 L	IM 10 L	IM 81 L	IM 57 L	IM 32 L	IM 11 L	PA1-913
<b>Besonderheit</b>							97 kDa Cal.like protein

#### **Sekundär-Antikörper :**

Anti-mouse IgG (whole molecule) Peroxidase conjugate, Sigma, Deisenhofen

Anti-rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase conjugate, Sigma, Deisenhofen

### 3.1.2.1 Proteinspezifische Elektrophorese - und Blot - Bedingungen

#### **MMP-13:**

12% Polyacrylamid - Gel; 25 µg Protein / Spur; Denaturieren der Proteinproben bei 95 °C für 5 Minuten; Low range Marker (Sigma)

##### **1. Antikörper:**

Monoklonaler Anti-Maus IgG-Antikörper gegen MMP-13 Kollagenase 3 (Ab-7) IM 81 L (Calbiochem), Verdünnung 1: 400 in 1x PBS, Inkubation bei 37°C für 2 h, Antikörper erkennt beide Formen: latent 60 kDa, aktiv 48 kDa.

##### **2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse)(Sigma), Verdünnung 1 : 10 000 in 1x PBS auf Schüttler für 1,5 - 2 h.

#### **MMP-1:**

12 % Polyacrylamid-Gel; 50 µg Protein konz./ Spur; ungekochte Proteinproben; Low range marker (Sigma)

##### **1. Antikörper:**

Monoklonaler Anti-Human IgG-Antikörper gegen die MMP-1 (interstitielle Kollagenase 1) (Ab-1) IM 35 L (Calbiochem), Verdünnung 1: 1000 in 1x PBS, Inkubation bei 37°C für 2 h, Antikörper erkennt beide Formen: latent 57-52, aktiv 46-42 kDa.

##### **2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse)(Sigma), Verdünnung 1: 2000 in 1xPBS auf Schüttler für 1,5 h.

#### **MMP-9:**

10% Polyacrylamid - Gel; 25 µg Protein/Spur; ungekochte Proteinproben; Broad range marker (BioRad) (prestained) oder High range Marker (Sigma)

##### **1. Antikörper:**

Monoklonaler Anti-Maus IgG-Antikörper gegen MMP-9 (Ab-2) IM 10 L (Calbiochem), Verdünnung 1: 400 in 1xPBS, Inkubation bei 37 °C für 2h,

Laufbande 83-95 kDa.

## **2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse)(Sigma),  
Verdünnung 1: 10 000 in 1xPBS, Inkubation bei RT für 1,5 h.

## **MT1-MMP:**

12% Polyacrylamid-Gel; 25 µg Protein/Spur; Denaturieren der Proteinproben bei 95°C für 5 Minuten; Low range Marker (Sigma)

### **1. Antikörper:**

MT1-MMP (Ab-4) (Calbiochem) erkennt 58 kDa-Protein, (geringe Kreuzreaktion mit humaner MMP3-Stromelysin 1, latent 57 kDa, aktiv 45 kDa), Verdünnung 1: 1000 in 1x PBS, Inkubation bei 37°C für 1 ½ h, erkennt MT1-MMP latent 66 kDa, aktiv 56 kDa.

### **2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse)(Sigma),  
Verdünnung 1 : 10 000 in 1xPBS, Inkubation bei RT für 2h.

## **TIMP-1:**

12% Polyacrylamid - Gel; 25 µg Protein/Spur; Denaturieren der Proteinproben bei 95°C für 5 Minuten; Low range marker (Sigma).

### **1. Antikörper:**

Monoklonaler Anti-Maus IgG-Antikörper gegen TIMP-1 (AB-1) IM 32 L (Calbiochem),  
Verdünnung 1:1000 in 1xPBS; Inkubation für 2 h bei 37°C; erkennt ein Protein bei ca. 28 kDa.

### **2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse) (Sigma),  
Verdünnung 1: 10 000 in 1xPBS; Inkubation bei RT für 2 h.

**TIMP-2:**

12% Polyacrylamid-Gel; 25 µg Protein/Spur; Denaturieren der Proteinproben bei 95°C für 5 Minuten; Low range marker (Sigma)

**1. Antikörper:**

Monoklonaler Anti-Maus IgG-Antikörper gegen TIMP-2 (Ab-2) IM 56-L (Calbiochem), Verdünnung 1: 1000 in 1xPBS, Inkubation für 2 h bei 37 °C, erkennt eine 24 kDa - Bande.

**2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG-Antikörper (goat-anti-mouse)(Sigma), Verdünnung 1: 10 000 in 1xPBS, Inkubation bei RT für 2 h.

**Calsequestrin:****1. Antikörper:**

Anti-Calsequestrin PA1-913 (Dianova), Verdünnung 1: 1000 in 1x PBS, Inkubation 1h bei 37°C.

**2. Antikörper:**

Peroxidase-konjugierter Anti-Rabbit IgG-Antikörper (goat -anti -rabbit, Sigma), Verdünnung 1: 10 000, Inkubation bei RT für 1h

### 3.1.3 Primer für RT-PCR

**Tab. 4: Primer-Sequenzen für DNA-Amplifikation RT-PCR**

Oligonukleotid-Primer	Sequence (5'→3')	Accession number
Pro-collagen type I (alpha2)		X58251
Primer sense	GTAAACACCCCAGCGAAGAACTC	
Primer antisense	TCAAACCTGGCTGCCACCAT	
Pro-collagen type III (alpha1)		X52046
Primer sense	ACCCAGAGATCCCATTGAG	
Primer antisense	AGGAAGCACAGGAGCAGGTG	
MMP-2		NM008610
Primer sense	CGCTCAGATCCGTGGTGAG	
Primer antisense	GGCTTGTCACGTGGTGTCAC	
MMP-9		X72795
Primer sense	CACCTTCACCCGCGTGTAC	
Primer antisense	TGCTCCGCGACACCAA	
MMP-13		X66473
Primer sense	AGAGGGTCTTCCCCGTGTTCT	
Primer antisense	GGCTCTGAATGGTTATGACATTCTG	
Mcol-A (MMP-1 der Maus)		NM_032006
Primer sense	GATTCCCCAGAGACATCCACA	
Primer antisense	TCCTCACAAACAGCAGCATCA	
MT1-MMP		U54984
Primer sense	AACTTTGACACCGTGGCCA	
Primer antisense	CAATGGGCATTGGGTATCC	
TIMP-1		NM011593
Primer sense	CACTCACTGTTTGTGGACGGA	
Primer antisense	CAAGCAAAGTGACGGCTCTG	
TIMP-2		NM_011594
Primer sense	GCAAGATGCACATTACCCTCTGT	
Primer antisense	CAGGCTCTTCTTCTGGGTGATG	
GAPDH		M32599
Primer sense	CCTGGACCACCCAGCCCAGCA	
Primer antisense	TGTTATGGGGTCTGGGATGGA	

MT1MMP (Membrane Type 1- Matrix Metalloproteinase)

TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)

TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)

MMP1 / MMP2 / MMP9 / MMP 13 (Matrix metalloproteinase 1/ 2 / 9/ 13)

### 3.1.4 Verwendete Lösungen

#### 3.1.4.1 Lösungen für Westernblot-Analyse

##### **Laufgel für Westernblot: 10%**

Aqua dest. 1,9 ml, 30% Acrylamid-Mix 1,7 ml, 1,5 M Tris (pH 8,8) 1,3 ml,  
10% SDS 0,05 ml, 10% Ammonium Persulfat 0,05 ml, TEMED 0,002 ml

##### **Laufgel für Westernblot: 12%**

Aqua dest. 1,6 ml, 30% Acrylamid-Mix 2,0 ml, 1,5 M Tris (pH 8,8) 1,3 ml,  
10% SDS 0,05 ml, 10% Ammonium Persulfat 0,05 ml, TEMED 0,002 ml

##### **Sammelgel für Westernblot:**

Aqua dest. 0,68 ml, 30% Acrylamid-Mix 0,17 ml, 1,0 M Tris (pH 6,8) 0,13 ml,  
10% SDS 0,01 ml, 10% Ammonium Persulfat 0,01 ml, TEMED 0,001 ml

##### **Probenpuffer Marc Wolff:**

2,0 ml Glycerol, 2,0 ml SDS 10%, 0,25 mg Bromphenol Blue, 2,5 ml Stacking Gel Buffer  
(6,06 g Tris (=0,5 M) und 4,0 ml SDS 10 % mit HCl auf 100 ml Aqua dest.,  
pH 6,8), 9,5 ml Aqua dest.  
Frisch jeweils 5 V/V %  $\beta$ -Mercaptoethanol dazugeben.

##### **Elektrophoresepuffer 10x :**

720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS, ad 5 l Aqua dest.  
Zum Gebrauch 1: 10 verdünnen.

##### **Transferpuffer: 1000 ml**

2,9 g Tris (= 25 mM), 14,5 g Glycin (= 190 mM), 200 ml Methanol (= 20%), Aqua dest  
hinzu, pH = 8,3 einstellen.  
(Substanzen abwiegen, Aqua dest. vorlegen, Methanol dazu, pH auf 8,3 einstellen, ad  
1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.)

**10x PBS:**

80 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ad 900 ml Aqua dest.,  
dann mit KOH auf pH =7,4 einstellen, auf 1000 ml auffüllen.

**Stripping Buffer:**

1 M Tris-HCl pH 6,8 , 10% SDS, 0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Blocker-Lösung:**

49,5 ml 1xPBS, 0,5 ml Western blocking Solution, 20  $\mu$ l Ziegenserum

**3. 1. 4. 2 Lösungen für Zymographie****Laufgel (Trenngel):**

30% Acrylamid-Mix 2,33 ml, Puffer 4% SDS 1,75 ml, Gelatine (3mg/ml) 2,33 ml  
(handwarm zugeben), Aqua dest 0,5 ml, 10% APS 70  $\mu$ l, TEMED 3,5  $\mu$ l

**Sammelgel :**

30% Acrylamid-Mix 0,5 ml, Puffer 0,4% SDS 0,625 ml, Aqua dest 1,375 ml,  
10% APS 25  $\mu$ l, TEMED 1,25  $\mu$ l

**Puffer Obergel :**

200 ml : 12 g Tris (= 0,1 M Tris), 0,8 g SDS (= 0,4% SDS), ad 150 ml Aqua dest.  
(Stäbchen), pH einstellen mit rauchender HCl auf 6,8 , ad 200 ml Aqua dest.

**Elektrophoresepuffer 10x :**

720 g Glycin, 151,5 g Tris, 50 g SDS, ad 5 l Aqua dest., 1: 10 verdünnen.

**Extraktionspuffer :**

10 mM Cacodylic acid 0,8 g, 150 mM NaCl 4,4 g, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 68,2  $\mu$ g,  
20 mM CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 1,47 g, 1,5 mM NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) 48,8 mg,

0,01 % TritonX-100 50 µl, 500 ml Aqua dest., auf pH 5,0 einstellen.

**Neutralization Buffer:**

1 M Tris/HCl 60,51 g, 500 ml pH 8,0

**Triton- Lösung:**

Triton 2,5% 25ml ad 1000 ml Aqua dest. (Aqua zuerst, Fischchen, Triton, homogene Lösung)

**Substratpuffer:**

50 µM Tris-HCL pH 8,0 , 5 mM CaCl<sub>2</sub>

**Entfärberlösung:**

500 ml Aqua dest., 100 ml Ethanol, 70 ml Essigsäure

Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen.

**3.1.4.3 Lösungen für RNA-Isolation und -Gele**

**20x MOPS-Puffer (pH 7,0):**

83,6 g Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), 33,2 ml 3 M Na-Acetat,

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1000 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

**100 ml Agarose / Formaldehydgel:**

1,2 g Agarose, 87,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, kurz aufkochen und dann abkühlen auf RT.

10 ml 10x MOPS-Puffer, 2,7 ml 37% Formaldehyd.

Gießen des Gels in einen 100 ml- Gelträger und erkalten lassen.

**RNA-Gel-Ladepuffer:**

50 % Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Bromphenolblau,

0,25 % Xylene Cyanol FF



**Vorbereitung der RNA-Probe:**

10 µg RNA, 10 µl Formamid, 4,4 µl 37 % Formaldehyd, 2,5 µl 10x MOPS-Puffer,  
2 µl RNA-Lade Puffer, 0,1 µl Ethidiumbromid

**DEPC-H<sub>2</sub>O:**

2 ml Diethylpyrocarbonat, 2000 ml Aqua dest., mind. 6 Stunden mit einem Magnetrührer  
mischen und anschließend autoklavieren.

Um RNase-frei zu arbeiten, werden alle Lösungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

### 3.1.5 $\beta$ 1-AR-transgene Myokardproben

Um die Rolle des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors auf die MMP-Expression in vivo zu untersuchen, werden Untersuchungen an Herzen transgener Mäuse mit einer Überexpression des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors durchgeführt. Dieses  $\beta$ 1-Adrenorezeptor-transgene Mausmodell wurde gemäß dem Standardverfahren zur Herstellung transgener Tiere (Hein et al., 1997) von der Arbeitsgruppe Engelhardt et al., Institut für Pharmakologie und Toxikologie Würzburg entwickelt und freundlicherweise für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Engelhardt et al., 1999). Die kodierende cDNA-Sequenz des humanen  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors (Frielle et al., 1987) wurde unter die Kontrolle des  $\alpha$ -MHC-Promotors ( $\alpha$ -Myosin-Heavy-Chain-Promotor) der Maus gestellt, welcher die Expression in adulten Vorhöfen und Ventrikeln der Maus reguliert. Daraus resultiert eine herzspezifische und myozytenspezifische Überexpression des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors.

In der vorliegenden Arbeit kommt die Maus-Linie  $\beta$ 1TG4 mit einer 15fachen  $\beta$ 1-AR-(Adrenorezeptor)-Überexpression zur Anwendung. Es werden Tiere der Altersklassen 3 Monate (normale Myokardstruktur), 5 Monate (Myokardhypertrophie und beginnende Fibrose) und 12 Monate (ventrikuläre Dilatation und ausgeprägte Fibrose, schwere Herzinsuffizienz) vs. altersentsprechende Kontrolltiere untersucht.

## **3. 2 Methoden**

### **3. 2 .1 Picro-Sirius-Rot-Kollagenfärbung**

Die Akkumulation von Typ I und Typ III Kollagen wird berechnet anhand morphometrischer Analysen von Sirius-Rot-gefärbten LV-Schnitten bei 10x Vergrößerung und Polarisationsmikroskopie (Mikroskop Nikon E600 + Lucia G Software, Düsseldorf).

#### **3. 2. 1. 1 Theoretische Grundlagen**

Die Picro-Sirius-Rot-Färbung ist eine Methode zur Kollagen-Bestimmung mit der Möglichkeit zur quantitativen morphometrischen Messung mittels digitaler Bildanalyse in lokal definierten Gewebsarealen. Die Methode ist auch besonders geeignet zur Evaluation sehr kleiner fibrotischer Läsionen und zur Abschätzung der Kollagenverteilung. Sirius Rot anfärbbar sind die Kollagen-Typen I und III (und VI). Die Sirius-Rot-Färbung muss auch unter polarisiertem Licht betrachtet werden, die Färbung würde ansonsten überschätzt da auch andere Strukturen außer Kollagen sich bei Lichtmikroskopie rot anfärben. Unter polarisiertem Licht hebt die Sirius-Rot-Färbung Kollagen Typ I hervor durch gelb-rötliche Licht-Doppelbrechung und Kollagen Typ III durch grüne Doppelbrechung (Junquera et al., 1979; Sweat et al., 1964).

#### **3. 2. 1.2 Durchführung der Picro-Sirius-Rot-Färbung**

Linksventrikuläre Gewebeproben von  $\beta 1$ -Adrenorezeptor-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren werden in 4% Formalin / PBS-Lsg. fixiert, in Paraffin eingebettet und mit einer 6  $\mu\text{m}$ -Schichtdicke transversal geschnitten. Nach Hydratation (absteigende Alkoholreihe) der entparaffinierten linksventrikulären Zirkumferenz-Schnitte (Dicke 6  $\mu\text{m}$ ) erfolgt die Inkubation in 0,1% "Sirius-Red-Picric-Acid" (Picro-Sirius-Red F3BA in Picric Acid saturated 100 ml) für 60 min. Vor der Dehydration (aufsteigende

Alkoholreihe) werden die Myokardschnitte mit 0,01 M HCL (Inkubation 2 min) behandelt, hiermit wird nicht gebundenes Sirius-Rot entfernt. Zur mikroskopischen Analyse werden die Gewebeschnitte mit Entellan (Schnell-Eindeckmittel, Merck/Darmstadt) bedeckt.

### **Protokoll: Picro-Sirius-Rot-Färbung**

3x 5 min Xylol, 2x 3min 100% Ethyl-Alkohol, 2x 3min 95% Ethyl-Alkohol, 3 min 80% Ethyl-Alkohol, 3 min Waschschrift mit Aqua dest., 60 min 0,1% Sirius-Rot-Lösung, 2 min 0,01 M HCl, 1 min 80% Ethyl-Alkohol, 2x 1min 95% Ethyl-Alkohol, 2x 10 min 100% Ethyl-Alkohol, 3x 3min Xylol, Eindecken mit Entellan und unter einem Abzug trocknen lassen.

### **3. 2. 1. 3 Auswertung**

Die Schnitte werden untersucht und photographiert mit einem Nikon E 600 Mikroskop (Vergrößerung 10x). Analyse und Quantifikation des Gesamtgehaltes an interstitiellem fibrillärem Kollagen werden mittels der Digital Image Software Lucia G (Nikon, Düsseldorf, Germany) durchgeführt. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen Kollagenfasern rot, andere Gewebe-Elemente gelb. Unter dem Polarisationsmikroskop erscheinen Kollagenfasern als orange-rote bzw. grüne Banden bei schwarzem Hintergrund. Der Unterschied von 12 µg gemessenem Kollagen entspricht kolorimetrisch einer 1,2fachen Zunahme. Es werden jeweils 5 Felder pro Tier im mittleren Drittel des Myokardschnittes evaluiert, jeweils 4-6 Tiere pro Altersgruppe. Die Daten werden hintergrundkorrigiert gewonnen, d.h. die Hintergrundintensität wird vom IOD-Wert (integrated optical density) subtrahiert. Die Daten werden dargestellt als "fractional area of collagen content in % of myocardial tissue". Eine Abschätzung der perivaskulären Fibrose erfolgt anhand von Gefäßquerschnitten.

## 3.2.2 Probengewinnung für Zymographien und Westernblot-Analyse

### 3.2.2.1 Präparation des Gesamthomogenats

Ähnliche Mengen linksventrikulärer Myokardproben (0,02-0,04 g) von jeweils  $\beta$ 1-Adrenorezeptor-transgenen Mäusen im Alter von 3 Monaten, 5 Monaten und 12 Monaten, sowie altersentsprechend jeweils Wildtyp-Mäusen als Kontroll-Tiere werden homogenisiert und lysiert in eiskaltem Extraktionspuffer (10 mmol /l cacodylic acid pH 5,0, 0,15 mol/l NaCl, 1  $\mu$ mol / l ZnCl<sub>2</sub>, 20 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mmol / l NaN<sub>3</sub>, 0,01% (v/v) Triton-X-100) mit dem Glas-Teflon-Potter (900 U/min).

Die Menge an Extraktionspuffer zur Gewebekomogenisierung berechnet sich wie folgt : Probenmasse in g x 5 = ml Menge Extraktionspuffer. Die Homogenate werden über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, danach zentrifugiert bei 4°C und 5000 rpm (Sigma-Zentrifuge) für 10 min. Der Überstand wird gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt.

Der pH-Wert der Gesamthomogenate muss für Zymographien auf 7,5 angehoben werden. Zymographie- und Immunoblotting-Elektrophorese erfolgen mittels einer Minigelelektrophoreseanlage und einer Spacerdicke von 0,8 mm (Bio-Rad, München).

### 3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgt nach der Methode von Lowry et al.(1951), einer kolorimetrischen Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocateau-Phenol-Reagens) wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Messung erfolgt mittels des "detergent compatible kit " (DC protein assay, Bio-Rad, München): 20  $\mu$ l Extraktionspuffer dienen als Blank. 2  $\mu$ l Probe werden mit 18  $\mu$ l Extraktionspuffer und 100  $\mu$ l A'-Lsg. (20  $\mu$ l S-Lösung in 1 ml A) versetzt. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l BioRad B-Lösung und 10 min Inkubation bei RT wird die Absorption der Lösung bei 540 nm photometrisch gemessen (Eppendorf-

Biophotometer). Als Standard dient Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml. Die Lowry-Proteinbestimmung erfolgt pro Tier als Doppelbestimmung.

### **3.2.3 Westernblot-Analyse**

#### **3.2.3.1 Sodium-(Natrium)-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-(SDS-PAGE)**

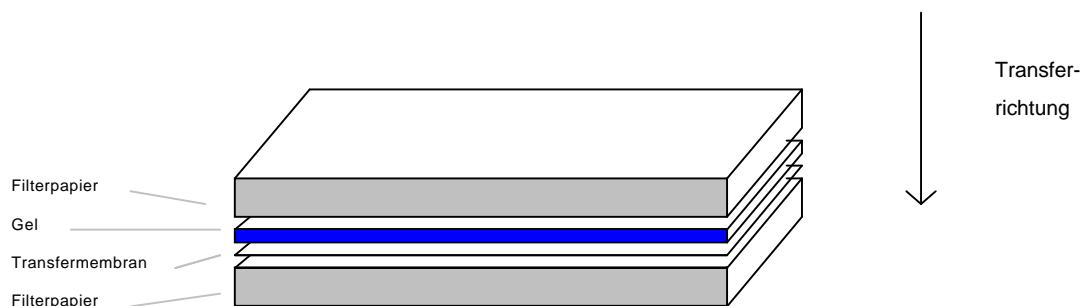
10 µl MMP-Standard (MMP-Kontrolle1, Sigma, Deisenhofen, Germany) dienen als qualitative Positiv-Kontrolle für MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2. Die in Sample Buffer verdünnten und ggf. 5 Minuten bei 95 °C gekochten Gewebshomogenate werden mit 25-50 µg Protein/Spur auf ein 10-12% SDS-Polyacrylamid-Gel (je nach Proteingröße 10 % -12 % SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese-Gele) aufgetragen und etwa insgesamt 4 Stunden mit 40 V für die Sammelphase und 70 V für die Laufphase elektrophoretisch aufgetrennt. (Ausnahme: Für MMP1-Western Blots wird kein Gesamthomogenat verwendet, sondern 50 µg an konzentrierten Proben, siehe 3.2.4.2). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Elektrophoresekammer Versatile Mini-Protean Electrophoresis Cell BIO-RAD (Bio-Rad, München, Art. 165-3301+165-3302). Zur Stromerzeugung wird der Powersupply Lightning Volt (Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA, Art. OSP-250L) verwendet. Parallel zu den Proben läuft jeweils passend ein Molekulargewicht-Standard:

Low Range Marker (Sigma, Molekulargewichtsbereich von 6,5 kDa bis 66 kDa), High Range Marker (Sigma, Molekulargewichtsbereich von 48 kDa bis 199 kDa) und Prestained SDS-Page Standard, Broad-Range (BIO-Rad, Molekulargewichtsbereich von 6,6 kDa bis 201 kDa).

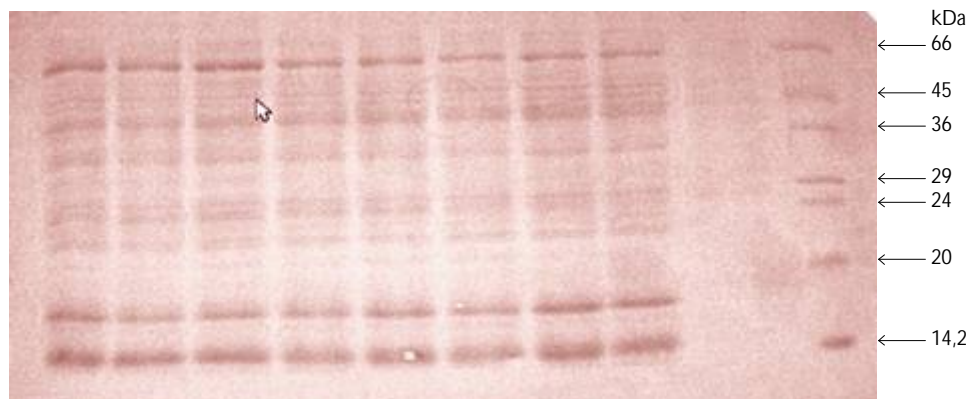
### 3.2.3.2 Immunoblotting

Die aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membrane Pore size 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) übertragen mittels “semi-dry electrophoretic blotting“ (0,8 mA /  $\text{cm}^2$ ). Gel, Nitrocellulose-Membran und Filterpapiere (BIO-RAD Filter Papier) werden mit Transferpuffer durchtränkt und nach dem Sandwich-Prinzip (siehe Abb.5) angeordnet unter Vermeidung von Luftblasen. Der Transfer erfolgt bei einem Gleichstrom von 200 mA über 50 Minuten mithilfe der Blotting-Vorrichtung: BIO-RAD Trans-Blot Semi-DRY Transfer Cell.

**Abb. 5: Blotting-Schema :** Trans-blot SD, Semi-dry-Transfer



Die relative Gesamtproteinbeladung und der erfolgreiche Proteintransfer werden mittels Ponceau-Rot-Färbung (1 Minute färben, mit Aqua dest. abspülen) der auf die Membran übertragenen Proteine nach dem Blotten überprüft. Die Molekulargewicht-Standards werden eingezeichnet.



**Abb. 6: Ponceau-Rot-Färbung exemplarisch**

12% Polyacrylamidgel mit 25µg Proteinauftrag/Spur nach Elektrophorese und Semi-Dry-Blot.

Das Bild zeigt eine Nitrocellulosemembran nach Ponceau-Rot-Färbung. Man erkennt, dass bei den im Vorversuch gewählten Blotbedingungen die relevanten Proteine zwischen 70 und 20 kDa komplett auf die Membran transferiert wurden. Die transferierten Proteinbanden geben Auskunft über einen gleichmäßigen Proteinauftrag der einzelnen Spuren.

Um unspezifische Bindungen zu reduzieren werden die Membranen anschließend in Blocker-Lösung (0,1% Western Blocking Reagent (Roche, Mannheim) und 0,02% Ziegen Serum in 1xPBS) bei RT übernacht geblockt. Dann werden die Membranen mit dem in PBS verdünnten MMP- bzw. TIMP-spezifischen primären Antikörper (1:1000 bis 1:400 siehe 3.1.5) 1 ½ - 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1xPBS+ 0,05% Tween (2x 5 min und 2x10 min) wird die Membran 1 ½ -2 Stunden bei RT mit Peroxidase-konjugiertem sekundären Antikörper (meist anti-mouse 1:10 000) inkubiert und anschließend erneut mit 0,05% Tween-1xPBS (2x 5 min und 1x 10 min) und 1xPBS (1x10 min) gewaschen. Die Antikörper gerichtet gegen MMPs und TIMPs wurden erworben von Calbiochem (Calbiochem, Bad Soden).

Die Entwicklung/Sichtbarmachung der Proteine erfolgt mit dem Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) gemäß den Benutzungshinweisen des Herstellers durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion, die zu einer Schwärzung der aufgelegten Röntgenfilme (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) im Bereich



der Antikörper-markierten Banden führt.

Um Schwankungen in der Proteinbeladung herauszumitteln wird Calsequestrin als Standard-Protein auf jedem Gel mituntersucht, um so die ermittelten Werte auf die Proteinladung normalisieren zu können. Die Membranen werden "gestrippt" (30 min bei 57 °C in Stripping Buffer (danach Waschen 2x10 min PBS-Tween und 1x10 min 1xPBS, anschließend 1 h Blocking Solution bei RT) und mit einem Calsequestrin- Antikörper (1:1000, PA1-913, Dianova, Hamburg) geblottet.

### **3.2.3.3 Auswertung**

Die jeweiligen Proteinbanden in den Autoradiographien werden mit Hilfe des Programms Image Quant "Personal densitometer " (Molecular Dynamics, Krefeld) quantifiziert. Die MMP-Banden werden jeweils auf das Signal von Calsequestrin normalisiert. Die Daten werden dargestellt als optische Dichte-Werte (OD, optical density) in Prozent einer Kontroll-Probe.

## **3.2.4 Zymographisches Aktivitäts-in-vitro-Assay (Zymographie)**

### **3.2.4.1 Prinzip der Zymographie**

Mit Hilfe der Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese ist es möglich, die substratspaltende Aktivität der Gelatinasen, wie MMP-2 und -9, nach deren Auftrennung in Substratgelen nachzuweisen. Das Substrat Gelatine wird in die Gelmatrix polymerisiert. Die Enzyme, hier die Gelatinasen, werden in SDS-Polyacrylamid-Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Dadurch bleiben ihre native Struktur und somit ihre Aktivität weitgehend erhalten. Jedoch wird durch Konfigurationsänderung das aktive Zentrum freigesetzt, sodass auch latente Enzymformen (latent in vivo) Gelatine in vitro im Gel verdauen. Die anschließende Inkubation in Reaktionspuffer (Substratpuffer) ermöglicht den Proteasen die Spaltung des Substrats in den Positionen im Gel, an denen sie sich nach der elektrophoretischen Trennung befinden. Diese Bereiche können über eine Färbung der im Gel verbliebenen Gelatine, z.B. mit Coomassie Brilliant

Blau, sichtbar gemacht werden. Die Gelatine-freien Bereiche zeichnen sich als helle Bereiche im ansonsten blau gefärbten Gel ab (siehe Abb .9).

#### **3.2.4.2 Aufkonzentrierung der Proben**

Um bei limitiert maximalem Volumen pro Slot höhere MMP-Konzentrationen und intensivere Banden zu erreichen, wird ein Teil der Gewebs-Gesamthomogenate mithilfe von Zentricons (Centricon Centrifugal Devices, Centricon YM-10 greentop, von Millipore, Bedford, MA 01730 USA) nach Herstellerangaben konzentriert :

Nach einem Zentrifugationsschritt kommt es zur Auftrennung des Homogenats in Überstand (Retentat) + Bodenstand (Filtrat). Es werden 50 µl Homogenat pro Tier genommen und entsprechend den Herstelleranweisungen in die Zentricons pipettiert.

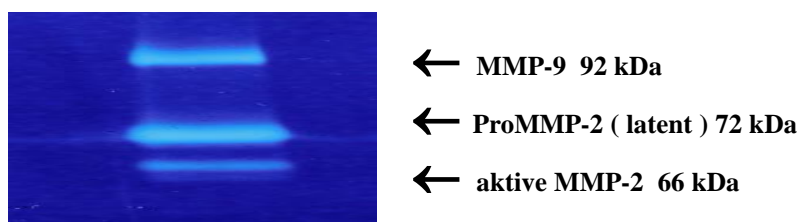
Die Homogenate werden bei - 4°C und 7500 rpm für 6 min zentrifugiert (Sigma Laborzentrifuge). Das Retentat wird aus den Zentricons in die zweite Zentriconreihe transferiert und runterzentrifugiert (3 min bei 4000 rpm). Danach erfolgt eine erneute Proteinbestimmung nach Lowry.

Da durch den Filtrationsvorgang im Rahmen der Aufkonzentrierung sehr kleine Proteine, unter anderem auch freie TIMPs, im Filtrat verloren gehen können, werden die konzentrierten Proben nur für die Zymographien und nicht für das Western Blotting benutzt (Ausnahme MMP-1).

#### **3.2.4.3 Gelatine-Zymographie-Gelelektrophorese**

Gelatine Typ B von boviner Haut (Sigma, Deisenhofen) wird bis zu einer Konzentration von 3 mg / ml unter leichtem Erhitzen und ständigem Rühren aufgelöst. Die Gelatine-Lösung wird der Standard-Laemmli-Acrylamid-Polymerisations-Mischung bis zur Endkonzentration 1 mg/ ml hinzugefügt. Da Gesamtvolumina großen Einfluss auf die Gleichmäßigkeit der zymographischen Banden haben können, müssen für zymographische Assays nicht nur gleiche Proteinmengen, sondern auch gleiche Volumina geladen werden. Jeweils 50 µg konzentriertes Gewebshomogenat wird mit Extraktionspuffer auf 5 µl

Probenvolumen gebracht und mit der Hälfte an Volumen, d .h. 2,5 µl pH-neutralem Extraktionspuffer (1 ml Extraktionspuffer + 40 µl TrisHCl 1 M) und 2,5 µl Loading Buffer (10% w/v SDS, 4% w/v Sucrose, 0,1% w/v BromphenolBlau) versetzt und in Slots (des 0,8 mm 10% Acrylamid Stacking Gels) geladen. Als Positivkontrolle wird 5 µl HT1080-Überstand (siehe Abb.9) mit auf das Gel aufgetragen und entsprechend den Proben mit Extraktionspuffer (pH-neutral) und Loading-Buffer verarbeitet. Überstand von HT 1080, einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie, wird als Positiv-Kontrolle herangezogen. HT1080-Zellen produzieren in starkem Maße Gelatinasen (MMP-2 72/66 kDa und MMP-9 92/83 kDa), die in den Zellkultur-Überstand abgegeben werden.



**Abb. 7: Überstand von HT 1080, einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie, dient als Positiv-Kontrolle.**

Nachweis der Enzym-Aktivität durch Zymographie-Assays: Lyse-Banden ersichtlich an Stellen mit Gelatinase-Verdau nach elektrophoretischer Auftrennung. Gelatine färbt sich blau, an Stellen des Verdaus weiße Banden.

Die elektrophoretische Auftrennung für die MMP-Zymographie erfolgt in der Gelapparatur Mini-Protein® 3 Cell (Bio-Rad, München, Art. 165-3301+165-3302). Zur Stromerzeugung wird der Powersupply Lightning Volt (Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA, Art.OSP-250L) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt über ca. 4 Stunden mit 40 V in der Sammelphase und 70 V in der Laufphase. Daraufhin werden die Gele in 2,5 % w/v Triton X-100 -Lösung unter sanftem Schütteln für 3x 20 min bei RT gewaschen. Es schließt sich ein Inkubationsschritt über Nacht bei 37 °C in Substrat-Puffer (50 mmol/l Tris-Cl mit pH 8,0, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>) an (ca. 12-13 Stunden). Die Zymographie-Gele werden wiederum unter sanftem Schütteln mit 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad, München) verdünnt in Ethanol für 2 Stunden gefärbt, danach in Entfärberlösung gegeben bis die Gelatinolyse-Banden als reine weiße Banden ersichtlich werden (ca. 2-3x ½ h), und schließlich für 45 Minuten getrocknet (Vakuum-

Heizplatte).

#### **3.2.4.4 Auswertung**

Die Quantifizierung erfolgt durch Densitometrie des größenfraktionierten Bandenmusters. Die Werte werden dargestellt als optische Dichtewerte in Prozent der entsprechenden HT1080-Bande als Kontrolle.

### **3.2.5 Analyse der mRNA-Expression**

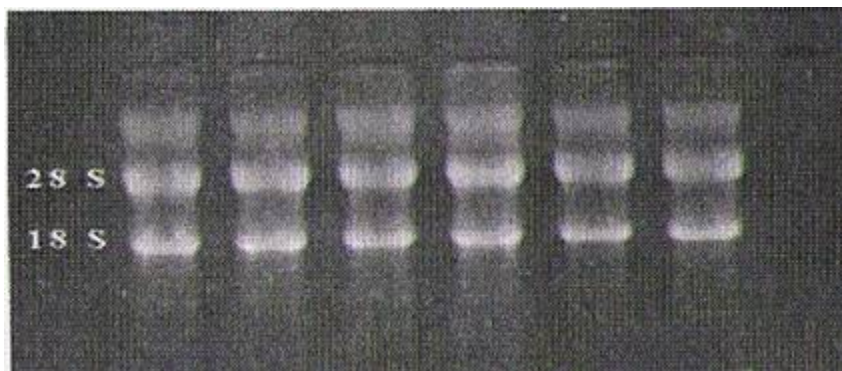
#### **3.2.5.1 RNA-Isolation aus Myokardproben und RNA-Gelelektrophorese**

Es gilt die hohe Labilität der mRNA zu beachten. Das Molekül ist höchst empfindlich für Degradation durch verschiedene RNAsen. Um einen Erhalt der mRNA für die Experimente zu sichern, wird das Gewebe entweder sofort weiter bearbeitet oder aber schnell eingefroren und bei -80 °C gelagert. Aus 50-100 µg tiefgefrorenem linksventrikulären Gewebe von  $\beta$ 1-Adrenorezeptor-transgenen Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren im Alter von 3 Monaten, 5 Monaten und 1 Jahr wird mit peqGOLD RNA Pure (Peqlab Biotechnology, Erlangen, Germany) nach Herstellerangaben und entsprechend der Methode von Chomczynski und Sacci (Chomczynski et al., 1987) RNA isoliert und anschließend spektrophotometrisch quantifiziert (Spectrophotometer DU 640, Beckmann, München). Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgt mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Der Quotient der beiden Wellenlängen gibt Hinweise auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA und liegt bei allen verwendeten Proben im Normbereich über 1,8.

Ethidiumbromid-gefärbte Agarose-Gele werden herangezogen, um die RNA-Integrität/Qualität zu prüfen:

Die RNA-Proben werden vor dem Auftrag auf das Gel 10 Minuten bei 65 °C denaturiert und danach 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese erfolgt bei 80

V in 1xMOPS-Puffer. Durch die Anfärbung der RNA mit Ethidiumbromid kann sie anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.



**Abb. 8: Ethidiumbromid-gefärbte RNA im UV-Licht nach elektrophoretischer Auftrennung:**

RNA-Gel zur Überprüfung der Qualität der Gesamt-RNA.

Die Banden sind scharf voneinander trennbar, von vergleichbarer Intensität. Das Größenverhältnis der ribosomalen 28S zur 18S Bande liegt zwischen 2:1 und 3:1. Dieses Verhältnis entspricht der in der Literatur geforderten Voraussetzung für eine intakte RNA.

Die Betrachtung unter UV-Licht von 312 nm Wellenlänge zeigt 2 Banden unterschiedlicher Intensität, die der 28 S- respektive der 18 S-rRNA entsprechen sowie einen feinen Schleier über der gesamten Laufspur, der der gesamten Population an mRNA, prä-mRNA, tRNA, snRNA und der restlichen rRNA entspricht.

### 3.2.5.2 DNase-Verdau

Die RNA-Proben werden zusätzlich einem sog. DNase-Verdau unterzogen: Mit Hilfe von DNase I (RNase Frei, Roche) als Endonuklease wird kontaminierende doppelsträngige DNA abgebaut. Dazu werden jeweils 10 µl RNA-Probe mit 10 µl Master Mix (6µl DEPC-H<sub>2</sub>O + 2µl PCR10xbuffer + 2µl DNase I) versetzt, für 30 min bei 25°C inkubiert und die Reaktion für 5 min bei 75°C abgestoppt. Die RNA wird anschließend in die Reverse Transkription eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

### 3.2.5.3 Reverse Transkription

Die extrahierte RNA wird reverse-transkribiert in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe von Sensiscript II Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany) und Random Primer Hexamers (Roche, Mannheim, Germany) entsprechend den Herstelleranweisungen/-protokollen. Die reverse Transkription der RNA in DNA erfolgt mit dem Sensiscript Rt Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Die isolierte mRNA wird quantifiziert (siehe 2.2.5.1) und 2 µg mit DEPC-Wasser auf insgesamt 10 µl Volumen gebracht. Nach Zugabe von 1 µl Random Primer (1:10 Verdünnung) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) wird das Gemisch 5 Minuten bei 65 °C erhitzt und danach auf Eis abkühlen gelassen. Dem RNA-Primer-dNTP-Gemisch wird nun ein Mix aus 4 µl 5x First-Strand- Puffer (Qiagen, Hilden), 2 µl DTT (Dithioethiol 0,1 M)(Qiagen, Hilden), 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 2 min bei 42°C inkubiert und mit 1 µl Superscript II - RT versetzt (mischen der Reaktionskomponenten durch sanftes Up-and-Down-Pipettieren) und für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert, gefolgt von einem 15 minütigen Inkubationsschritt bei 70 °C. Template Konzentration 2 µg/ 20 µl (Stock), davon 1:4 Verdünnung (5µl Reverse Transkription-Produkt + 95 µl A.dest.), so dass 10 ng in 2 µl verdünntem Template für die Real-Time-PCR zum Einsatz kommen. Das Produkt der reversen Transkription (cDNA, 20 µl Endvolumen) wird bei - 20 °C weggefroren.

### 3.2.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

#### 3.2.5.4.1 Polymerase-Kettenreaktion ( PCR ) allgemein

Die PCR erlaubt die millionenfache selektive Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Spezifität dieser Reaktion für eine gesuchte Sequenz in der Ziel-

DNA wird durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern erreicht, die die gesuchte Sequenz sowohl auf dem (+)- als auch auf dem (-)Strang der Ziel-DNA erkennen. Nach Aufschmelzen der ds-DNA in zwei Einzelstränge lagern sich die Oligonukleotidprimer an die komplementären Sequenzen der DNA an. Die zugesetzte DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) synthetisiert ausgehend von den angelagerten Primern neue DNA-Stränge. Durch wiederholte Denaturierung der DNA und Annealing der Primer kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gesuchten DNA-Sequenz. Nach 40 Zyklen liegen ca. 1 Milliarde Kopien vor. Die PCR wird zur quantitativen Bestimmung der Genexpression durch Amplifikation der komplementären cDNA-Sequenzen herangezogen. Die Technik ist auch zur Messung der Genexpression auf mRNA-Level geeignet. Dazu wird die isolierte RNA (siehe 3.2.5.1) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (siehe 3.2.5.3). Diese wird dann in die PCR eingesetzt.

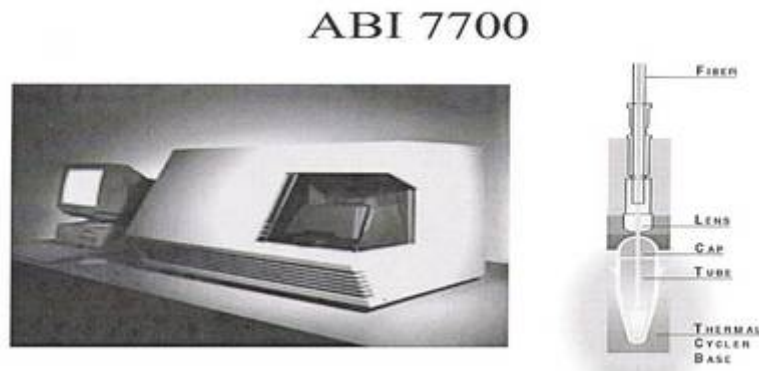
#### **3.2.5.4.2 TaqDNA-Gold-Polymerase**

Die TaqDNA-Polymerase (*Thermus-aquaticus* DNA Polymerase) ist ein thermostabiles Enzym und wurde ursprünglich zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen der Polymerasen-Kettenreaktion verwendet. Ampli TaqGold DNA-Polymerase ist eine chemisch modifizierte Form der AmpliTaq®DNA-Polymerase. Diese Modifikation inaktiviert das Enzym. Durch einen "High-Temperature"- Inkubationsschritt (HOT Start) kommt es zur Aktivierung des Enzyms (und somit erst wenn die DNA vollständig denaturiert ist). Wenn also AmpliTaqGold DNA-Polymerase bei Raumtemperatur zur Reaktionsmischung dazugegeben wird, ist das inaktive Enzym zur Primer-Extension noch nicht fähig.

#### **3.2.5.4.3 TaqMan-quantitative RT-PCR und Dateninterpretation**

Die quantitative RT-PCR Analyse wird durchgeführt mittels des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System +Software (TaqMan-Gerät, PE Applied Biosystems). Es detektiert ein fluoreszierendes Signal, welches die exponentielle Akkumulation des PCR-Produktes widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit kommt ein Farbstoff/Fluorochrom zum Einsatz, der mit der DNA interkaliert und danach über

Fluoreszenz detektierbar wird (SYBR-Green I Dye, PE Biosystems).

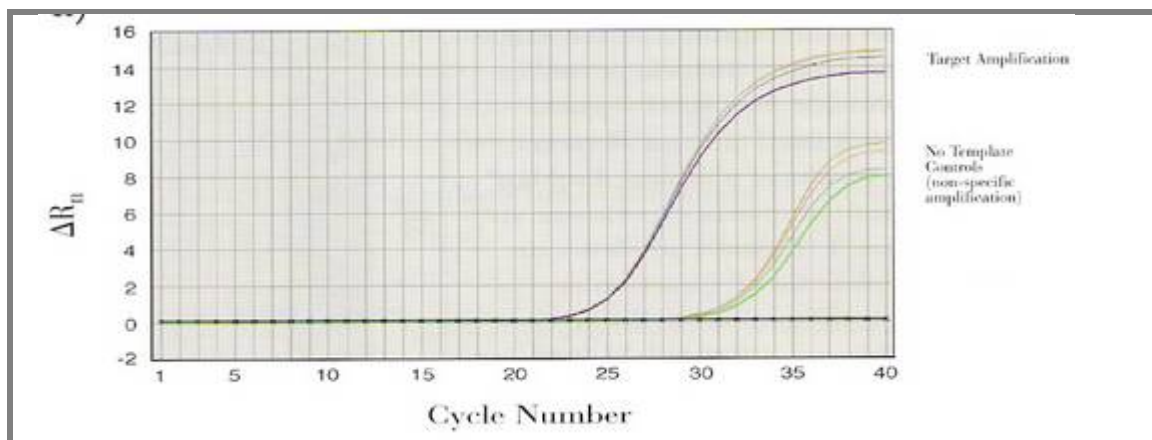


**Abb.10: TaqManGerät : ABI PRISM 7700 Sequence Detection System + Software**  
 (PE Applied Biosystems, Germany), bestehend aus Thermocycler und Multiplex-Fiber-Optik-System für Fluoreszenzanalysen. Die Erregung von Fluorochromen (hier: SYBR-Green I als DNA-bindender Stoff) in der Reaktionslösung erfolgt mittels Laser. Das TaqMan-System erlaubt die Analyse von 96 Proben in 2 Stunden.

Real-time-Systeme bieten die Möglichkeit PCR-Produkte noch während der Amplifikation zu detektieren. Die Reaktionen sind charakterisiert durch den Zyklus-Punkt, an dem die Amplifikation sich immer noch in der exponentiellen Phase befindet, was eine präzise Quantifizierung der RNA während einer weiten dynamischen Spannbreite ermöglicht. Die Real-time-PCR basiert auf Fluoreszenz-Emission. Während der Extensionsphase der PCR wird ein Fluoreszenzsignal frei, das alle 8,5 sec von einem Sequenz-Detektor registriert wird. Das Signal wird normalisiert auf eine interne Referenz (dRn). Es wird ein "threshold cycle" Ct festgesetzt. Der Ct-Wert ist die Zyklusnummer, bei der das Fluoreszenzsignal eine definierte Schwelle überschreitet (Amplifikation befindet sich in der exponentiellen Phase) und wird zur Quantifizierung der eingesetzten Target number (Menge an Ziel-Gen) ermittelt. Für jede Probe wird die Menge an Ziel-Gen und an endogener Referenz bestimmt anhand der Standardkurve (absolute Quantifizierung gegen eine Standardkurve; die absolute Quantifizierung vergleicht den Ct-Wert einer unbekannten Probe gegen eine Standardkurve mit bekannter Copy-Anzahl).



In dieser Arbeit werden alle Proben in Triplikaten geführt. Die relativen und absoluten Mengen der Transkripte werden bestimmt unter Zuhilfenahme der Standardkurvenmethode und normalisiert auf die GAPDH mRNA-Expression. GAPDH als Housekeeping-Gen wird als interner Referenzstandard verwendet und dient der Korrektur von Abweichungen im Grad des RNA-Abbaus und der Effizienz der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription, wodurch eine verlässliche mRNA-Quantifizierung möglich ist. Die Glyzerinaldehyd-3 Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glykolyse und wird in allen Körperzellen etwa gleich stark exprimiert. Sie gilt als nicht reguliertes Enzym, so dass auch die mRNA der GAPDH immer in gleicher Menge vorliegen sollte. Eine externe GAPDH-Standard-Kurve wird generiert und verwendet, um die Ct-Werte in pg umzurechnen. Standardlösungen werden hergestellt durch serielle Verdünnungen (100000 pg bis 10 pg) von GAPDH-cDNA. Die GAPDH-Standard-Kurve läuft als Duplikat bei jedem Versuch mit. Die Menge an Ziel-Gen wird geteilt durch die endogene Referenz -Menge um normalisierte Zielwerte zu erhalten.



**Abb. 10 : Modell für TaqMan-Amplifikations-Plot (Quantitative Bestimmung der Gen-Expression gemessen mit TaqMan RT-PCR) :**

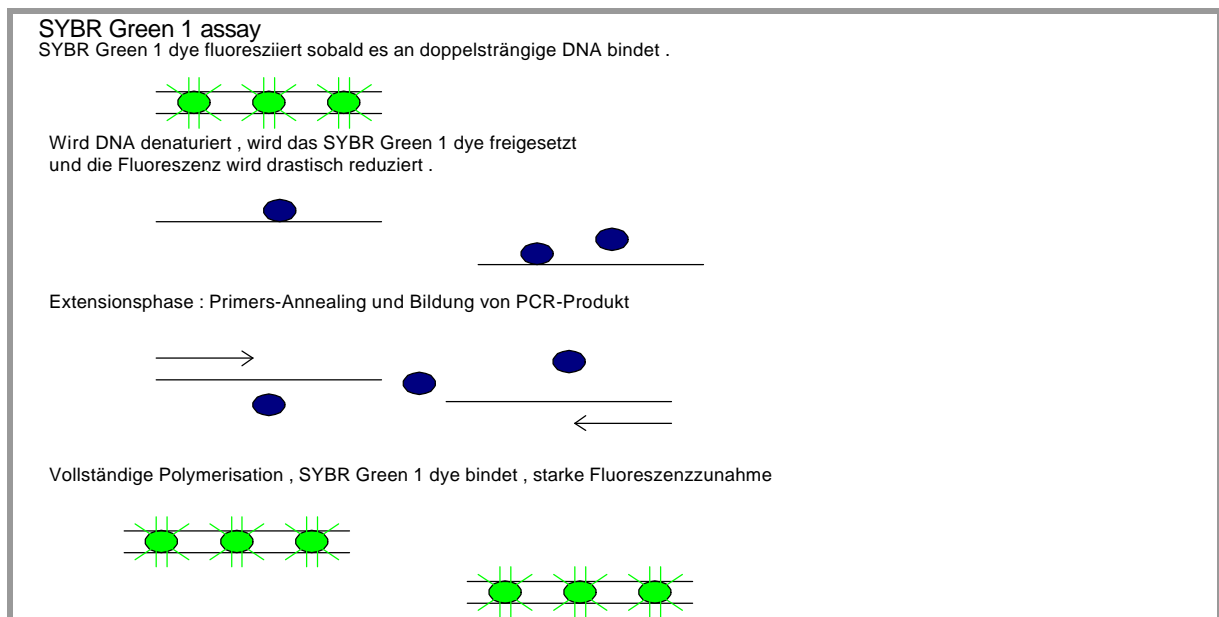
Die Software erstellt für jede Probe einen Amplifikationsplot. Die Quantifizierung der entstandenen DNA erfolgt über die Identifizierung des exakten Punktes, an dem ein linearer Anstieg, im Vergleich zum Hintergrund, zu erkennen ist (crossing point), auch Ct-Wert genannt. Eine starke Überexpression einer bestimmten mRNA-Sequenz ist an den niedrigen Ct-Werten (Cycle number/Threshold) im Amplifikationsplot zu erkennen.

Das Amplifikationsplateau ist das PCR-Stadium, während dessen / in dem das gewünschte Amplifikationsprodukt nicht mehr exponentiell akkumuliert.

Um Fluoreszenzschwankungen zu vermeiden, die nicht durch die PCR bedingt sind, wird mit Hilfe der ABI PRISM Software das Fluoreszenzsignal der gesuchten Sequenz durch das Fluoreszenzsignal eines internen Referenzfarbstoffes ROX geteilt (dRn).

### 3.2.5.4.3.1 SYBR Green 1 Assay und Passive Referenz (ROX)

Die Aufnahme von SYBR Green 1 Dye in einer Real-Time PCR-Reaktion erlaubt die Detektion von jeglicher doppelsträngiger DNA, die während der PCR generiert wird. Somit wird jedoch sowohl spezifische als auch unspezifische Produkt-Bildung ein Signal generieren. Die Verwendung von Hot Start Enzym AmpliTaqGold DNA-Polymerase minimiert jedoch die Bildung von nichtspezifischen Produkten .



**Abb. 11: SYBR Green 1 Assay**

Die passive Referenz (ROX) ist ein Fluorochrom und im SYBR Green PCR Master Mix mitenthalten, welches nicht an der PCR-Amplifikation teilnimmt. Auf dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System dient die passive Referenz als interne Referenz, auf welche der SYBR Green/dsDNA-Komplex-Signal normalisiert wird während der Datenanalyse. Eine Normalisierung ist notwendig um well-to-well-Fluoreszenz-Fluktuationen zu korrigieren.

### 3.2.5.4.3.2 Oligonukleotid-Primer und Optimierung der Primer-Konzentrationen

Primer für das TaqMan- System werden mit Hilfe der Primer Express™ software (Perkin Elmer) designed und hergestellt von PE ABI (Weiterstadt, Germany). Alle Primers werden so designed, dass sie ein Intron überspannen um ein Annealing an genomische DNA zu verhindern; die Amplikon-Größe wird zwischen 66-93 bp gewählt. Es gilt die minimale Primer-Konzentration zu bestimmen, die den niedrigsten Threshold Cycle (Ct -Wert) ergibt und das maximale  $\Delta R_n$ , während unspezifische Amplifikation minimiert wird, d.h. höchste Signal-to-Noise-Ratio (= low Ct mit cDNA und keine Amplifikation mit NTC “no template control” oder genomischer DNA). Im Rahmen der Optimierungsversuche erwies sich für die obigen Primersequenzen folgendes Primer-Verhältnis als am günstigsten :

Reverse Primer (nM) : Forward Primer (nM) = 200 nM : 200 nM

### 3.2.5.4.3.3 Reaktionsbedingungen

In einem 25 µl Reaktions-Mix sind enthalten :

2 µl RT-Produkt (10 ng template cDNA) +23 µl PCR Master Mix Buffer (SYBR Green)  
+ jeweils 200 nM der Sense und Antisense Primer.

Der SYBR®Green PCR Master Mix enthält alle Komponenten, die notwendig sind für eine Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR®Green I Dye, abgesehen von den Primern. Zur Detektion des PCR-Produktes bedient man sich der Messung von Floreszenz-(Zunahme), die verursacht wird durch das Binden von SYBR Green Dye an die doppelsträngige (ds)-DNA. (siehe SYBR Green 1 Assay)

#### **SYBR Green PCR Master Mix :**

SYBR Green I Dye + AmpliTaqGold®DNAPolymerase + dNTPs mit dUTP + Passive Referenz (ROX) + “optimized buffer components” (Reaktionspuffer)

Die Reaktionslösungen werden bei RT auf die MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate pipettiert (siehe Sample Type Setup) unter Verwendung von Pipettenspitzen mit Filter zur Vermeidung von Kontaminationen. Alle Proben werden in Triplikaten geführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC A1	NTC A2	NTC A3	NTC A4	STDN A5 1.0e+03	STDN A6 1.0e+03	STDN A7 1.0e+03	STDN A8 1.0e+03	STDN A9 2.0e+03	STDN A10 2.0e+03	STDN A11 2.0e+03	STDN A12 2.0e+03
B	STDN B1 5.0e+03	STDN B2 5.0e+03	STDN B3 5.0e+03	STDN B4 5.0e+03	STDN B5 1.0e+04	STDN B6 1.0e+04	STDN B7 1.0e+04	STDN B8 1.0e+04	STDN B9 2.0e+04	STDN B10 2.0e+04	STDN B11 2.0e+04	STDN B12 2.0e+04
C	UNKN C1	UNKN C2	UNKN C3	UNKN C4	UNKN C5	UNKN C6	UNKN C7	UNKN C8	UNKN C9	UNKN C10	UNKN C11	UNKN C12
D	UNKN D1	UNKN D2	UNKN D3	UNKN D4	UNKN D5	UNKN D6	UNKN D7	UNKN D8	UNKN D9	UNKN D10	UNKN D11	UNKN D12
E	UNKN E1	UNKN E2	UNKN E3	UNKN E4	UNKN E5	UNKN E6	UNKN E7	UNKN E8	UNKN E9	UNKN E10	UNKN E11	UNKN E12
F	UNKN F1	UNKN F2	UNKN F3	UNKN F4	UNKN F5	UNKN F6	UNKN F7	UNKN F8	UNKN F9	UNKN F10	UNKN F11	UNKN F12
G	UNKN G1	UNKN G2	UNKN G3	UNKN G4	UNKN G5	UNKN G6	UNKN G7	UNKN G8	UNKN G9	UNKN G10	UNKN G11	UNKN G12
H	UNKN H1	UNKN H2	UNKN H3	UNKN H4	UNKN H5	UNKN H6	UNKN H7	UNKN H8	UNKN H9	UNKN H10	UNKN H11	UNKN H12

Abb. 12 : Typisches “Set-up” der MicroAmp® Optical 96-Well -Reaktionsplatte

Bezeichnung der Wells :

NTC: No Template Control, UNKN: unknown (= Probe, unbekannte mRNA-Menge), STDN : Standard

### Thermocycling-Bedingungen :

Die PCR wird durchgeführt entsprechend einem 2-Stufen PCR-Protokoll:

5 min bei 95 °C + 40 Zyklen (15s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C).

Die Ampli TaqGold-DNA-Polymerase wird initial aktiviert durch eine 5 minütige Inkubation bei 95 °C. Jeder der 40 PCR-Zyklen besteht aus 15 s Denaturierung bei 95 °C und Hybridisation von Primer (Annealing) mit Extension für 1 min bei 60 °C.

### 3.2.5.4.3.4 Vermeidung unspezifischer Produktbildung :

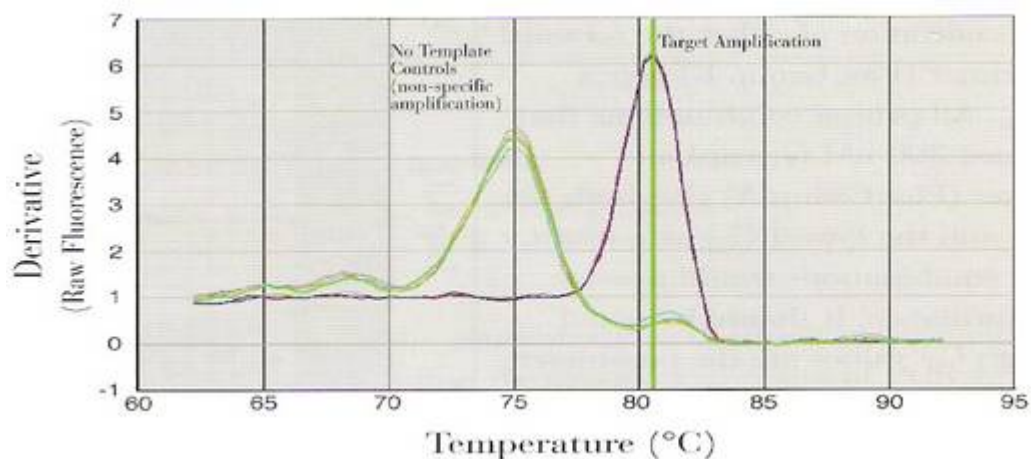
Eine mögliche Kontamination kann erfolgen durch Proben mit hohen DNA-Konzentrationen, durch DNA Template Controls, oder durch PCR Carryover-Kontamination aus vorherigen Versuchen. Zusätzlich würde durch die unspezifische Natur von SYBR Green I jede doppelsträngige DNA detektiert werden. Es wird deswegen empfohlen, nach unspezifischer Produktbildung zu suchen durch Dissoziationskurven - oder Gel-Analyse.

### HOT Start PCR :

Um die PCR-Spezifität und -Sensitivität zu erhöhen und “mispriming events“ zu kontrollieren, wurde die Hot Start Technik eingeführt. Der ursprüngliche PCR-Prozess wurde dahingehend verändert, dass die Amplifikationsreaktion bei einer erhöhten Temperatur gestartet wurde. Die AmpliTaqGold DNA-Polymerase ist für einen effizienten automatischen Hot Start notwendig.

### Dissoziationskurven :

Unspezifische Amplifikation, einschließlich Primer-Dimere, können die Qualität der Amplifikationsdaten negativ beeinflussen. Das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System ermöglicht Dissoziationskurven (“Schmelzkurven“) zu erstellen, um unspezifische Amplifikation zu detektieren.



**Abb. 13: Amplikon-unabhängige Amplifikation (Primer-Dimere)**

**Zur Verbesserung der Spezifität bei der SYBR Green Methode wird zusätzlich eine Schmelzkurve durchgeführt. Anhand der für jede PCR-Sequenz typischen Schmelztemperatur erfolgt die Identifikation des spezifischen PCR-Amplikons.**

Die obige Dissoziationskurve (Schmelzkurve) zeigt eine typische Primer-Dimer-Formation. Das spezifische Produkt ist gezeigt bei  $T_m$  80,5 °C, während die Primer-Dimere charakteristischerweise tiefer liegen bei  $T_m$  75 °C.

Die Gefahr der Primer-Dimere ist am größten in No Template Control (NTC) wells und Sample wells mit nur niedrigen Template -Konzentrationen.

Die Erstellung der Schmelzkurve erfolgt anhand eines 3-Stufen-Protokolls :

95°C für 0,15 min, 60°C für 0,15 min, 95 °C für 0,15 min.

Die Schmelzkurve darf nur ein Peak pro Zielgen aufweisen, anhand dessen die typische Schmelztemperatur der gesuchten PCR-Sequenz abgelesen und somit die Identifikation des spezifischen PCR-Amplicons erfolgt.

**Ermittelte Schmelzpunkte:** GAPDH 82,0 °C, 18 S 79,3 °C, Procollagen Type I

(Alpha 2) 79,8 °C, MMP-13 77,7 °C, MMP-1 (MCol A) 76,7 °C, MMP-9 86,0 °C ,  
MT1-MMP 79,5 °C, MMP-2 80,5°C, TIMP-2 78,3 °C, TIMP-1 79,6°C .

#### **3.2.5.4.4 Auswertung**

Durch die Korrelation zwischen Zunahme der Fluoreszenzintensität und PCR-Amplicon-Anzahl kann die Software für jede Probe einen Amplifikationsplot erstellen, anhand dessen der Ct-Wert ermittelt werden kann. Die Auswertung erfolgt durch die komparative Ct-Methode.

## **3.7 Auswertung**

### **3.7.1 Densitometrien und Fotografien**

Alle Westernblots und Zymographien werden mit dem Molecular Dynamics Personal Densitometer 68-272 ausgewertet. Die Signalstärken der jeweiligen Banden werden gegenüber dem Hintergrund korrigiert.

Die Picro-Sirius-Rot gefärbten Schnitte werden mit einem Nikon E 600 Mikroskop untersucht. Analyse und Quantifikation des Kollagengehaltes erfolgt hintergrundkorrigiert mittels der Digital Image Software Lucia G (Nikon, Düsseldorf).

Die quantitative Bestimmung der Gen-Expression erfolgt mittels des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System+Software nach der komparativen Ct-Methode.

### **3.7.2 Statistik**

Die angegebenen Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wird mittels des Bonferroni t-Tests bestimmt. Statistische Signifikanz wird für  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Überexpression des $\beta 1$ -adrenergen Rezeptors bedingt

#### Veränderungen des myokardialen Kollagengehaltes

#### 4.1.1 Erfassung der Gesamtkollagen-Expression durch Picro-Sirius-Rot-Färbung

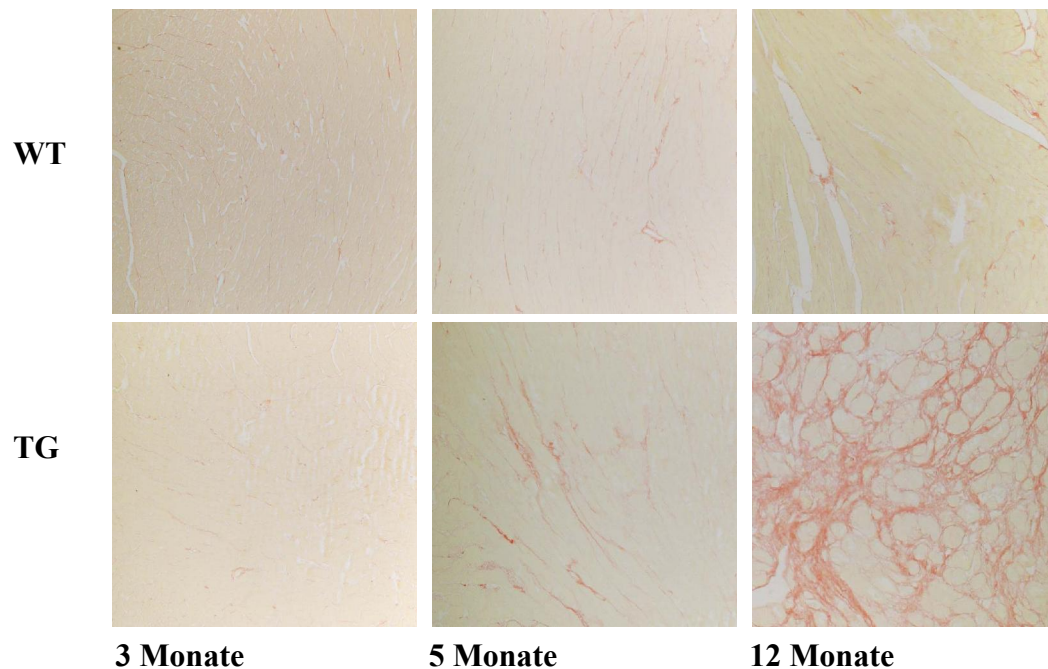
Die Bild-Analyse der Sirius-Rot-gefärbten linksventrikulären Gewebeschnitte dient der Bestimmung des kardialen Gewebegehaltes an Gesamtkollagen der Typen I und III. Die Quantifizierung der rot gefärbten Kollagenfasern im Verhältnis zum Gesamtgewebe („fractional area“) erfolgt funktionell und morphologisch durch digitale Bildanalyse.

Die Analyse erfolgt an 3 Zeitpunkten in Abhängigkeit von der Entwicklung des kardialen Phänotyps: 3 Monate (normale Myokardstruktur), 5 Monate (Myokardhypertrophie und beginnende Fibrose), 12 Monate (ventrikuläre Dilatation und ausgeprägte Fibrose).

$\beta 1$ -AR-transgene Mäuse in jungem Alter (3 Monate) mit „normalem“ Myokardgewebe weisen einen im Vergleich zur Wildtypgruppe unveränderten Gesamtkollagengehalt von 1,5 % „fractional area“ auf. Mit 5 Monaten erhöht sich der Kollagengehalt in den transgenen Tieren signifikant um 3,6 %. Die Verbreiterung des Endo- und Permysiums ist begleitet von einer kardiomyozytären Hypertrophie. Die Struktur des Myokards bleibt erhalten. Mit 12 Monaten sind in der transgenen Gruppe 17% des myokardialen Gewebes durch Kollagenfasern ersetzt. Teilweise sind die interstitiellen Septen stark verbreitert. Zusätzlich gibt es flächenhafte Areale mit aufgehobener interstitieller Netzwerkstruktur im Sinne einer Ersatzfibrose („Replacement Fibrose“). Die Wildtyp-Kontrollmäuse weisen hingegen im Myokardgewebe einen Kollagengehalt von ca. 1,2 % „fractional area“ auf, was sich auch mit zunehmendem Alter nicht ändert (3 Monate: WT  $1,19 \pm 0,04$ , TG  $0,88 \pm 0,2$ ; 5 Monate: WT  $0,95 \pm 0,11$ , TG  $4,41 \pm 0,48$ ; 12 Monate: WT  $1,19 \pm 0,24$ , TG  $17,25 \pm 2,28$ ;  $n=5$ ;  $p<0.05$  für 5mTG vs. 5mWT, 12mTG vs. 12mWT, 3mTG vs. 5mTG, 5mTG vs. 12mTG). Gelegentlich kann eine geringe perivaskuläre Fibrose in den alten transgenen Tieren beobachtet werden, was jedoch ohne statistische Signifikanz bleibt.



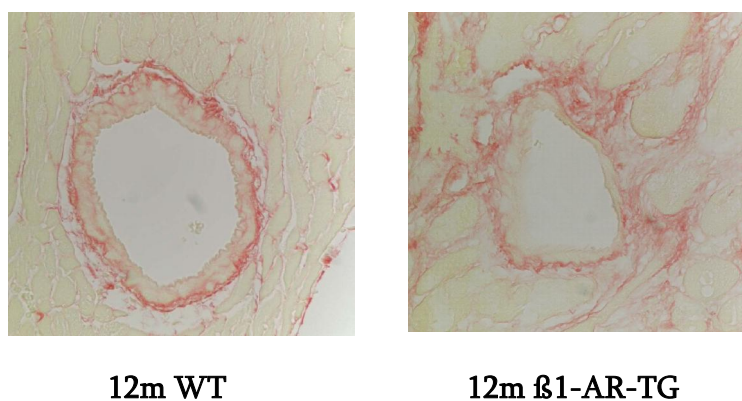
**Abb. 14 : Erfassung der Gesamtkollagen-Expression durch Picro-Sirius-Rot-Färbung**



**A ) Interstitielles myokardiales Gesamt-Kollagen (Kollagen Typ I und Typ III):**

Sirius-Rot-gefärbte (= Gesamtkollagen) myokardiale Zirkumferenz -Schnitte des linken Ventrikels (Vergrößerung 10x, Mikroskop Nikon E60).  $\beta$ 1-AR-transgene Mäuse (TG) im Alter von 3 Monaten (ohne Fibrose), 5 Monaten (Myocytenhypertrophie und geringe Fibrose) und 12 Monaten (schwere Herzinsuffizienz mit ventrikulärer Dilatation und ausgeprägter Fibrose) werden verglichen mit altersentsprechenden Wildtyp (WT) - Kontrolltieren.

Die Abb. zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Sirius-Rot-Färbung von repräsentativen  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen.

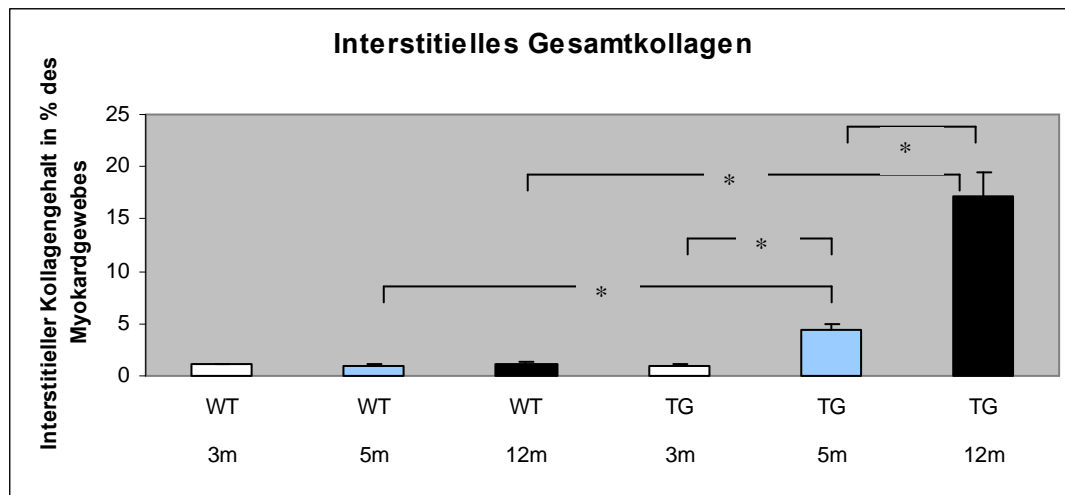


**B) Perivaskuläres Kollagen:**

Minimale Veränderungen als perivaskuläre Fibrose in den 12 Monate alten transgenen Tieren ohne statistische Signifikanz.

Abb. 15 :Quantifizierung des Kollagen-Gehaltes

A)



B)

LV-Kollagengehalt „fractional area“	3m	5m	12m
WT	1,19 ± 0,04	0,95 ± 0,11	1,19 ± 0,24
TG	0,88 ± 0,2	4,41 ± 0,48	17,25 ± 2,28

**A) Kollagen-Gehalt in % des linksventrikulären Myokardgewebes (= „fractional area“):**

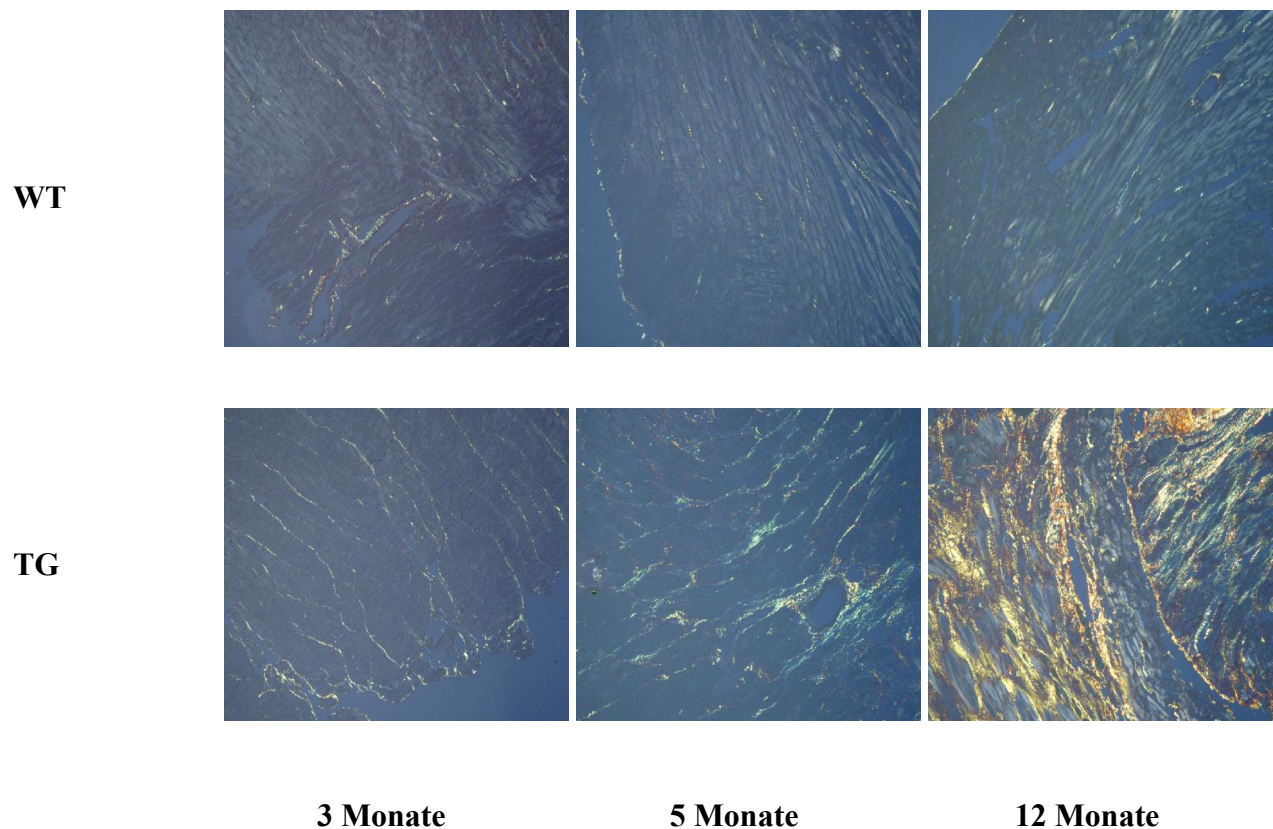
Quantifikation der Sirius-Rot-gefärbten Gewebeschnitten mit der Lucia G Software (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Werte werden angegeben als „fractional area“ des Gesamtmyokardgewebes. \* =  $p < 0.05$

**B) Tab.:** Relativer interstitieller Gesamtkollagen-Gehalt in % des LV-Myokardgewebes. Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.  $n = 5$  pro Gruppe.

#### 4.1.2 Polarisationsmikroskopischer Nachweis der Kollagentypen I und III

Die Darstellung der Sirius-Rot-Färbung unter polarisiertem Licht ermöglicht eine annähernde Differenzierung von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Unter polarisiertem Licht hebt die Sirius-Rot-Färbung Kollagen-Typ I hervor durch gelbrötliche Licht-Doppelbrechung und Kollagen-Typ III durch grüne Doppelbrechung. Trotz eindeutiger Fibrose scheint sich das Verhältnis von Kollagen-Typ I zu Typ III in der  $\beta 1$ -AR-transgenen Linie mit zunehmender Herzinsuffizienz nicht zu verändern.

**Abb. 16 : Polarisationsmikroskopische Darstellung der Kollagentypen I und III**



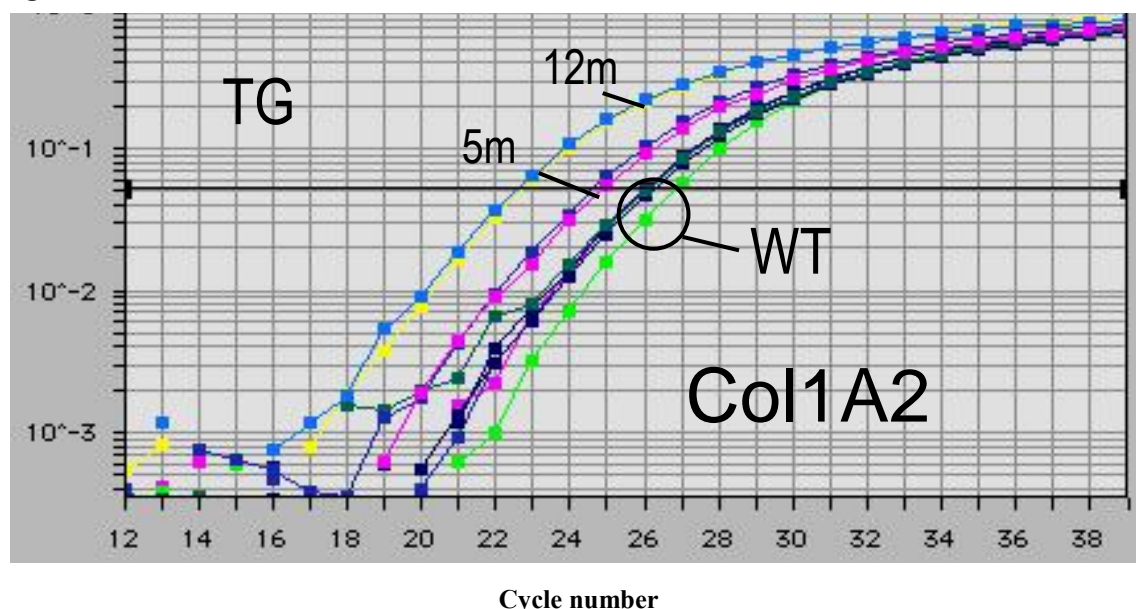
Repräsentative Sirius-Rot-gefärbte myokardiale Zirkumferenz-Schnitte des linken Ventrikels (Vergrößerung 10x) betrachtet unter Polarisationsfilter (Mikroskop Nikon E 600); Kollagen Typ I = orange-gelb, Kollagen Typ III = grün.  
 $\beta 1$ -AR-transgene Mäuse (TG) im Alter von 3 Monaten (ohne Fibrose), 5 Monaten (Myocytenhypertrophie und geringe Fibrose) und 12 Monaten (schwere dilatative Herzinsuffizienz und ausgeprägte Fibrose) werden verglichen mit altersentsprechenden Wildtyp (WT) –Kontrolltieren. Das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ III war stets unverändert.

### 4.1.3 Regulation der Pro-Kollagen Typ I und Typ III mRNA-Expression

Die beschriebene Zunahme an Kollagen-Proteingehalt in den  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen ist auf eine Zunahme der Pro-Kollagen-Typ I (alpha2) und - Typ III (alpha 1) - mRNA-Expression zurückzuführen (Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA / GAPDH mRNA: 5m WT  $0,09 \pm 0,02$ ; TG  $0,14 \pm 0,03$ ;  $n=5-6$ ;  $p > 0,05$ ; Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA / GAPDH mRNA: 5m WT  $0,06 \pm 0,02$ ; TG  $0,17 \pm 0,04$ ;  $n=5-6$ ;  $p > 0,05$ ). Vor dem Einsetzen einer manifesten Herzinsuffizienz im Alter von 5 Monaten zeigt sich eine moderate Erhöhung der Pro-Kollagen-Transkription in transgenen Mäusen, welche aber keine Signifikanz gegenüber den Wildtypen erreicht. Das Stadium der manifesten Kardiomyopathie infolge chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation ist jedoch begleitet von einer 6fachen Erhöhung an Pro-Kollagen Typ I sowie -Typ III mRNA-Expression in den 1 Jahr alten  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen (Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA / GAPDH mRNA: 12m WT  $0,07 \pm 0,02$ ; TG  $0,43 \pm 0,05$ ;  $n=5-6$ ;  $p < 0,05$ ; Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA / GAPDH mRNA: 12m WT  $0,06 \pm 0,01$ ; TG  $0,43 \pm 0,08$ ;  $n=5-6$ ;  $p < 0,05$ ).

Abb. 17 : TaqMan-Quantitative Real-Time PCR von Pro-Kollagen Typ I (alpha 2) mRNA

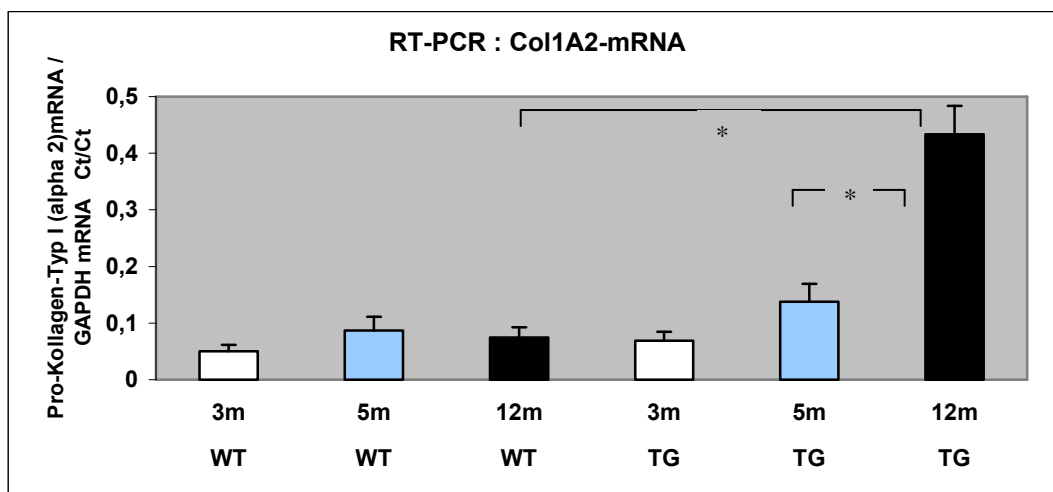
log  $\Delta R_n$



Repräsentativer TaqMan-Amplifikationsplot von Wildtypmäusen (WT) und  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) für Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA. Die starke Überexpression der Pro-Kollagen Typ I (alpha 2)mRNA in den 12 Monate alten Transgenen ist am niedrigen Ct-Wert (Cycle number / Threshold) im Amplifikationsplot zu erkennen. Rn = normalized reporter signal

Abb. 18 : Quantifizierung Pro-Kollagen Typ I (alpha2) -mRNA-Expression

A)



B)

Pro-Kollagen-TypI (alpha2) Ct/Ct	3 m	5 m	12 m
WT	0,05 ± 0,01 n=5	0,09 ± 0,03 n=6	0,07 ± 0,021 n=4
TG	0,07 ± 0,02 n=5	0,14 ± 0,03 n=6	0,43 ± 0,05 n=4

**A) TaqMan-RT-PCR für Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA:**

Quantifizierung der mRNA-Expression von Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m).

Die Threshold cycle (Ct)-Werte werden dargestellt als Verhältnis von Pro-Kollagen Typ I (alpha 2) mRNA zu GAPDH mRNA (als Housekeeping- Gen).

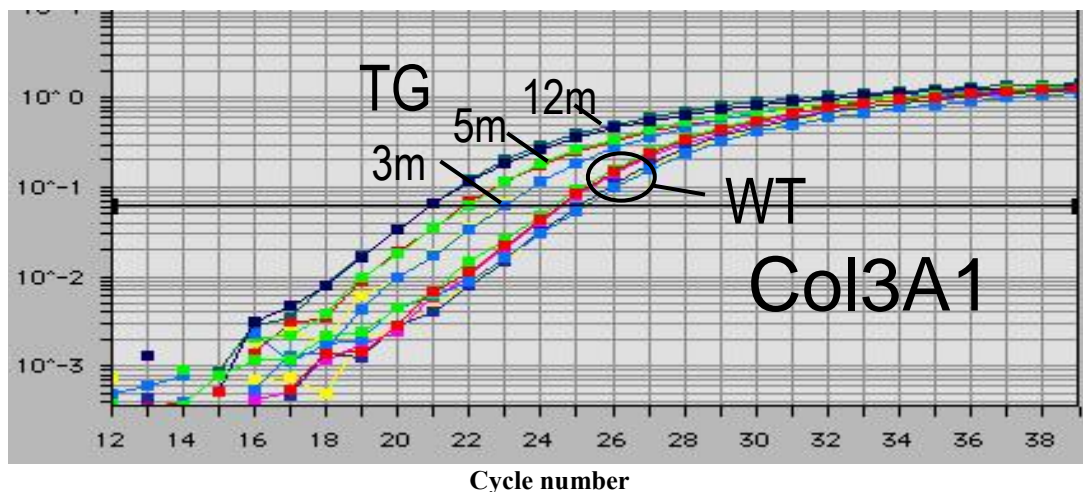
\* =  $p < 0.05$

**B) Tab.:** Relative Pro-Kollagen Typ I (alpha 2) mRNA-Konzentrationen (Pro-Kollagen Typ I (alpha2) mRNA / GAPDH mRNA).

Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.



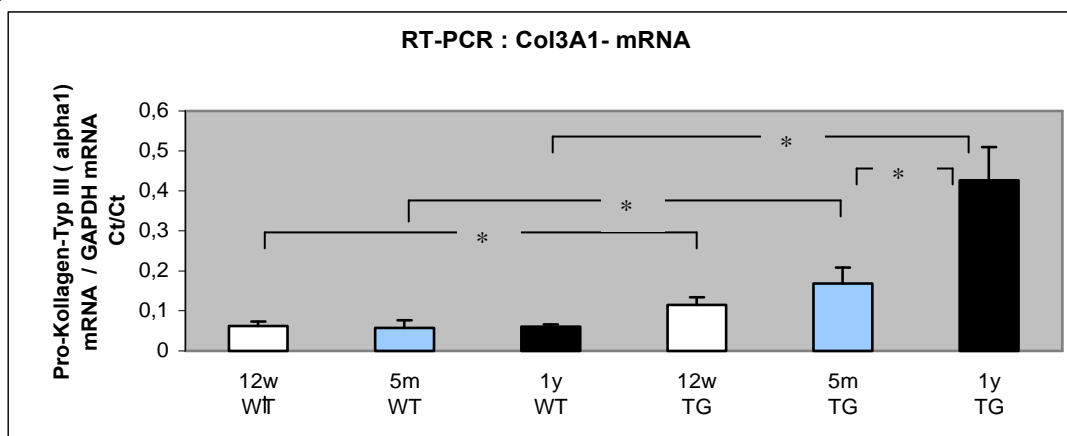
Abb. 19 : TaqMan - quantitative Real-Time PCR von Pro-Kollagen Typ III (alpha1)mRNA

log $\Delta$ Rn

TaqMan-Amplifikationsplot von repräsentativen  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtypmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) für Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA.  
Rn = normalized reporter signal

Abb. 20 : Quantifizierung der Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA-Expression

A)



B)

proCol III (alpha1) mRNA Ct/Ct	3m	5m	12m
WT	0,06 $\pm$ 0,01 n=5	0,06 $\pm$ 0,02 n=6	0,06 $\pm$ 0,01 n=4
TG	0,12 $\pm$ 0,02 n=5	0,17 $\pm$ 0,04 n=4	0,43 $\pm$ 0,08 n=4

**A) TaqMan-RT-PCR für Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA:**

Quantifizierung der mRNA-Expression von Pro-Kollagen Typ III (alpha1) in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m).

Die Threshold cycle (Ct)-Werte werden dargestellt als Verhältnis von Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA zu GAPDH mRNA (als Housekeeping-Gen).

\* =  $p < 0.05$

**B) Tab.: Relative Pro-Kollagen Typ III (alpha1) mRNA-Konzentrationen (Pro-Kollagen Typ III (alpha1)mRNA / GAPDH mRNA).**

Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 4.2 Gelatinasen: Einfluss des $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors auf die Expression und Aktivierung der Gelatinasen

### 4.2.1 Regulation der MMP-2 (Gelatinase A) im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1- AR-transgener Mäuse

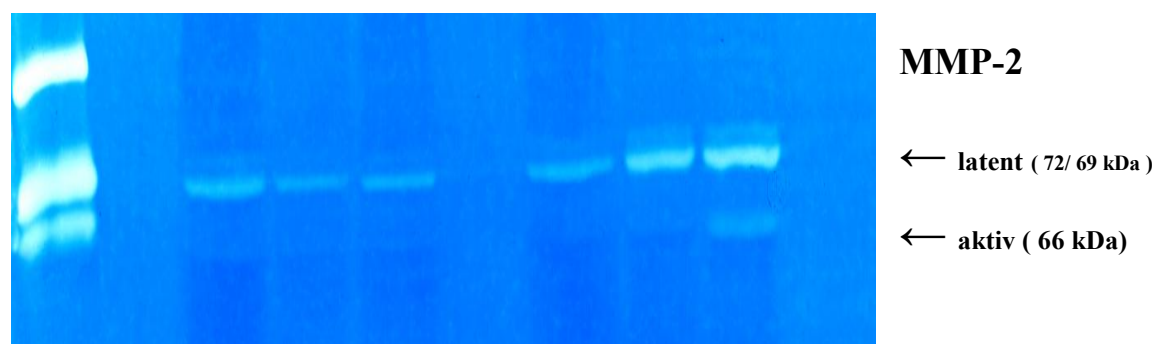
#### 4.2.1.1 Zymographische MMP-2-Enzymaktivität

Die meisten Matrix Metalloproteinasen werden als sog. Zymogene in der extrazellulären Matrix gelagert bevor sie aktiviert werden. Dieses gilt auch für die Gelatinase MMP-2 als erwiesen. Die Enzymaktivität dieser Gelatinase kann mittels einer Gelatine-in-gel-Technik (Zymographien) bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Technik ist die latente/inaktive Form (72 kDa) von der aktiven Form (66 kDa) der MMP-2 (Gelatinase A) zu unterscheiden.

Die Untersuchung von Wildtyp-Mäusen und  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen unterschiedlichen Alters entsprechend der fortschreitenden Erkrankung von normaler Myokardstruktur (3 Monate) über Myokardhypertrophie (5 Monate) zu ventrikulärer Dilatation (12 Monate) zeigt eine Aktivierung der MMP-2 in den 1-Jahr-alten transgenen Mäusen mit schwerer Herzinsuffizienz. Die aktive MMP-2 (66 kDa) baut Gelatine und Fibronektin durch proteolytische Spaltung ab, welches verantwortlich ist für das Kollagen-Crosslinking, und erfährt eine signifikante Zunahme auf das bis zu 3,8-fache in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen mit schwerer interstitieller Fibrose und ventrikulärer Dilatation (12 Monate) verglichen mit den altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen, in denen sie kaum nachweisbar ist (aktive MMP-2 OD /control 12 Monate: WT  $0,04 \pm 0,01$ , TG  $0,14 \pm 0,03$  n=7; 12m WT vs. 12mTG  $p < 0,05$ ).

Auch der Gesamtprotein-Gehalt an MMP-2 nimmt in den transgenen Mäusen im Laufe der Zeit kontinuierlich zu. Die Wildtyp-Kontroll-Tiere hingegen zeigen keine Regulation des MMP-2 Protein-Levels und zymographisch auch keine Aktivierung des Enzyms (MMP-2 latent OD/ control: 3 Monate WT  $0,63 \pm 0,029$  , TG  $0,8 \pm 0,07$ ; 5 Monate WT  $0,75 \pm 0,08$  , TG  $1,17 \pm 0,07$ ; 12 Monate WT  $0,81 \pm 0,03$  , TG  $1,36 \pm 0,17$ ; n= 6-7; 3mTG vs. 12mTG, 5mWT vs. 5mTG, 12mWT vs. 12mTG  $p < 0,05$ ).

Abb. 21 : Zymographische Enzymaktivität der MMP-2



HT1080      3m      5m      12m      3m      5m      12m  
 WT      WT      WT      TG      TG      TG

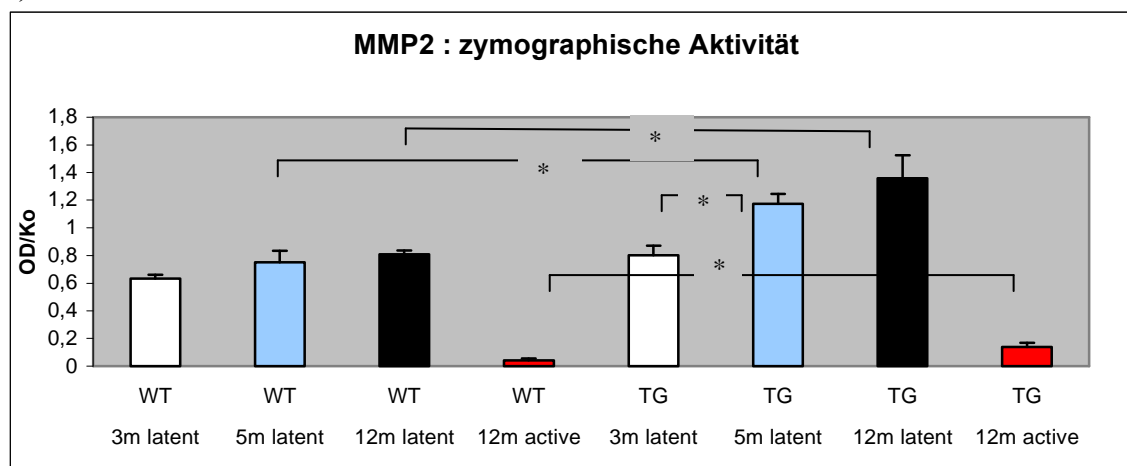
#### Repräsentative Zymographie von linksventrikulären Gesamthomogenaten:

Verglichen werden  $\beta$ 1-AR-transgene Mäuse (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) mit den altersentsprechenden Wildtyp (WT) - Kontrolltieren. HT 1080 diente als Positiv-Kontrolle.

Die ProMMP-2 ( 72 kDa )-Protein-Expression nimmt in den transgenen Tieren (Alter: 5 Monate und 12 Monate) kontinuierlich zu, verglichen mit den entsprechenden Kontroll-Mäusen. Signifikante MMP-2-Aktivierung in 12 Monate alten Transgenen mit Ventrikeldilatation und schwerer Herzinsuffizienz. Ein sehr schwaches Aktivitätssignal von MMP-2 kann in einigen transgenen Mäusen bereits im Alter von 5 Monaten nachgewiesen werden.

Abb. 22: Relative zymographische Aktivität der MMP-2

A)



B)

MMP-2-Aktivität OD/Ko	3m	5m	12m latent	12m aktiv
WT	0,63 ± 0,03 n=6	0,75 ± 0,08 n=6	0,81 ± 0,03 n=7	0,04 ± 0,01 n=7
TG	0,80 ± 0,07 n=7	1,17 ± 0,07 n=6	1,36 ± 0,17 n=7	0,14 ± 0,03 n=7

A) Densitometrische Analyse der zymographischen MMP-2-Lyse-Banden normalisiert auf HT 1080 als qualitativ-quantitative Positivkontrolle; OD=optical density  
 Ansteigende Konzentration von pro-MMP-2 (72 kDa) in transgenen Tieren (TG) mit Progression der Erkrankung zu Hypertrophie (ab 5 Monaten) und schließlich zu Herzinsuffizienz (12 Monate) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren (WT).  
 MMP-2 Aktivität (66 kDa) wird nachgewiesen in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen mit schwerer Herzinsuffizienz im Alter von 1 Jahr.

B) Tab.: Relative zymographische Aktivität und relativer Proteingehalt der Gelatinase-A (MMP-2).



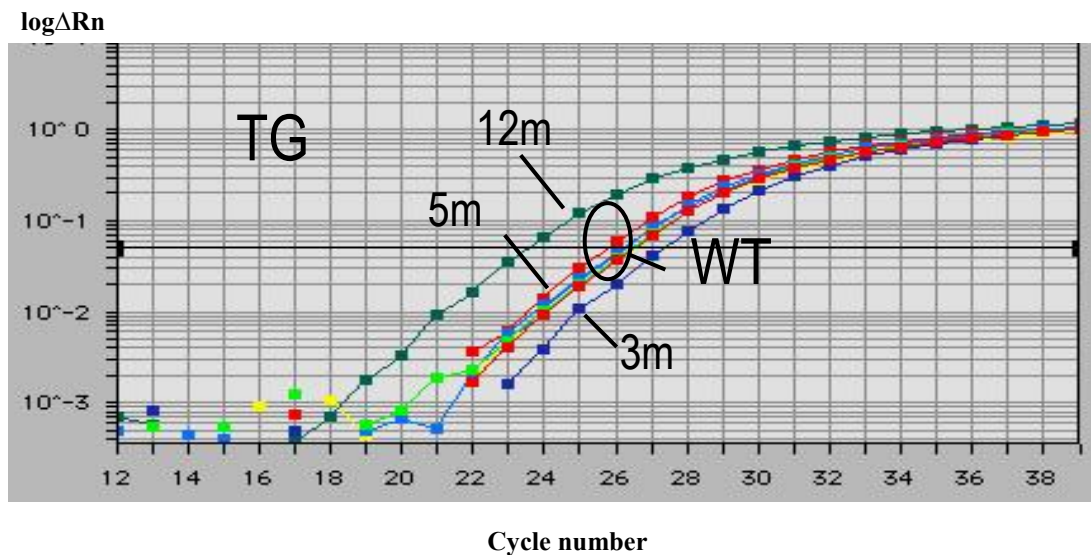
Densitometrische Werte normalisiert auf HT 1080 (aktive MMP-2-Bande).  
Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass es unter einer chronischen  $\beta$ 1-adrenergen Stimulation in Korrelation mit der Entwicklung einer Myokardhypertrophie und einer moderaten interstitiellen Fibrose zu einer um das 1,5fache signifikant gesteigerten Expression der proMMP-2 kommt. Bei anhaltendem sympathoadrenergem Stimulus kommt es zu einem weiteren Anstieg der proMMP-2 Expression bei gleichzeitiger Aktivierung. Bei den Tieren mit schwerer Herzinsuffizienz (12 Monate) kann bei allen eine aktive MMP-2 (66 kDa)-Bande nachgewiesen werden. Bereits bei einem Teil der transgenen 5 Monatstiere ist eine schwache Lysebande auf Höhe der aktiven MMP-2 zu detektieren, ohne dass bereits eine messbare Ventrikeldilatation vorliegt. Diese Daten zeigen, dass es sich bei der Aktivierung der MMP-2 um einen kontinuierlichen Prozeß handelt und somit die Aktivierung der MMP-2 zur Gefügedilatation beitragen könnte. Die WT-Daten zeigen, dass es keine altersabhängige Regulationsgröße für die MMP-2-Expression gibt.

#### **4.2.1.2 proMMP-2-mRNA-Expression**

Die Erhöhung des latenten pro-MMP-2-Protein-Levels in transgenen Mäusen wird verursacht durch eine erhöhte Transkription an proMMP-2-mRNA gemessen durch TaqMan quantitative RT-PCR. Die proMMP-2- mRNA-Expression ist entsprechend auf das ca. 4,4fache hochreguliert in 12 Monate-alten transgenen Mäusen verglichen mit 3 Monate- und 5-Monate alten  $\beta$ 1-AR-transgenen (TG) und den Wildtyp-Mäusen (MMP-2 mRNA/GAPDH mRNA: 3 Monate WT  $0,04 \pm 0,01$ ; TG  $0,04 \pm 0,01$ ; 5 Monate WT  $0,05 \pm 0,02$ ; TG  $0,09 \pm 0,03$ ; 12 Monate WT  $0,06 \pm 0,02$ , TG  $0,22 \pm 0,04$ ; n= 4-6;  $p < 0,05$  für 3mTG vs. 12mTG, 12mWT vs. 12mTG und 5mTG vs. 12mTG). Eine altersabhängige Expression der proMMP-2-mRNA ist in den Wildtypmäusen nicht zu beobachten.

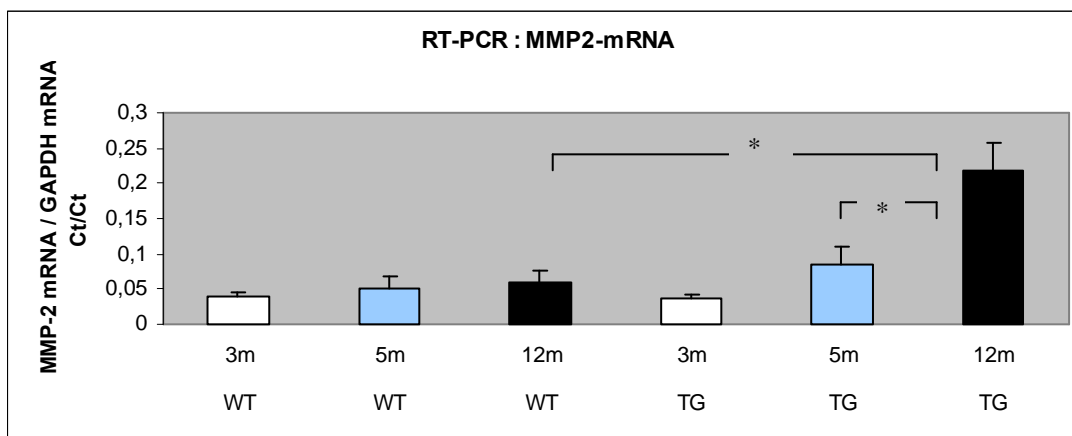
Abb. 23 : TaqMan- quantitative Real-Time-PCR von proMMP-2 mRNA



TaqMan-Amplifikationsplot von repräsentativen  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtypmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) für proMMP-2-mRNA.  $R_n$ =normalized reporter signal

Abb. 24 : Quantifizierung der proMMP-2-mRNA-Expression

A)



B)

proMMP-2 mRNA Ct/Ct	3m	5m	12m
WT	0,04 $\pm$ 0,01 n=5	0,05 $\pm$ 0,02 n=6	0,06 $\pm$ 0,02 n=4
TG	0,04 $\pm$ 0,01 n=5	0,09 $\pm$ 0,03 n=6	0,22 $\pm$ 0,04 n=4

## A) TaqMan-RT-PCR für proMMP-2-mRNA:

Quantifizierung der mRNA-Expression von proMMP-2-mRNA in  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m).

Die Daten werden angegeben als Ct-Werte in Relation zum internen Standard (Housekeeping - Gen) als Verhältnis von proMMP-2 mRNA zu GAPDH mRNA. \* =  $p < 0.05$

Man beobachtet eine zunehmende Erhöhung der proMMP-2-mRNA-Expression mit Fortschreiten der Herzerkrankung in den transgenen Mäusen.

## B) Tab.: Relative proMMP-2 mRNA-Konzentrationen (proMMP-2 mRNA/ GAPDH mRNA).

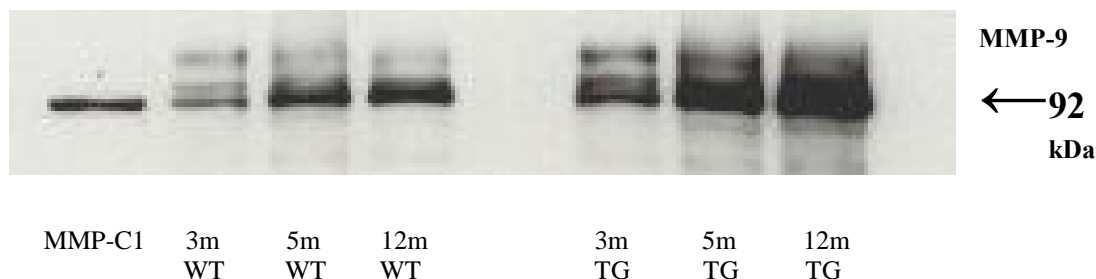
Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 4.2.2 Regulation der MMP-9 (Gelatinase B) im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1-AR-transgener Mäuse

### 4.2.2.1 MMP-9-Proteinexpression

MMP-9, die zweite Matrix Metalloproteinase, die zur Gruppe der Gelatinasen gehört (Gelatinase B), wird im Verlauf der Herzinsuffizienzentwicklung ebenfalls vermehrt exprimiert. Die höchsten Level werden in transgenen Mäusen mit Dilatation und Herzinsuffizienz gemessen (12 Monate alte  $\beta$ 1-AR-transgene Mäuse). Der MMP-9 Protein-Level ist zwar in Wildtyp-Tieren im Alter von 1 Jahr auch erhöht, die Werte sind aber signifikant niedriger als diejenigen gemessen in transgenen Mäusen mit Herzinsuffizienz (MMP-9: OD/control: 3 Monate WT  $0,9 \pm 0,27$ , TG  $1,1 \pm 0,33$ ; 5 Monate WT  $0,9 \pm 0,07$ , TG  $2,0 \pm 0,29$ ; 12 Monate WT  $2,42 \pm 0,54$ , TG  $4,2 \pm 0,35$ ;  $n=5-7$ ;  $p<0.05$  für 5mWT vs. 5mTG, 12mWT vs. 12mTG, 5mWT vs. 12mWT, 5mTG vs. 12mTG).

**Abb. 25 : Immunoblot-Analyse der MMP-9 (Gelatinase B) – Protein-Expression**



#### **MMP-9: Repräsentativer Westernblot der Gelatinase B (MMP-9):**

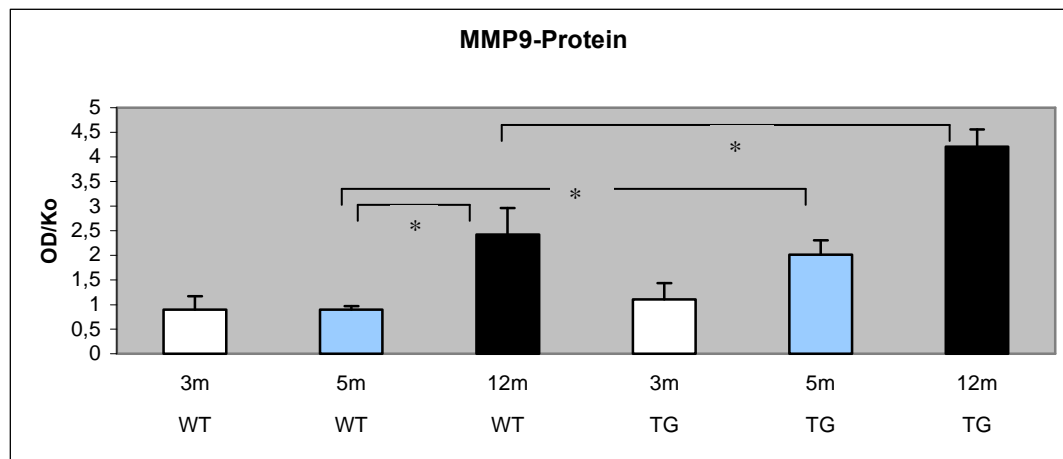
Gesamthomogenate von transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden mit 25  $\mu$ g Protein/Spur auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem MMP-9-Antikörper (1:400) inkubiert.

Immunoreaktives Protein wird mittels ECL Chemolumineszenzreaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

MMP-C1 dient als qualitative Positiv-Kontrolle.

Abb. 26 : Quantifizierung der MMP-9-Proteinexpression

A)



B)

MMP-9-Protein OD/Ko	3m	5m	12m
WT	0,90 ± 0,27 n=6	0,9 ± 0,07 n=7	2,42 ± 0,54 n=5
TG	1,11 ± 0,33 n=5	2,01 ± 0,29 n=7	4,21 ± 0,36 n=5

A) Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung.

OD= optical density; \* = p &lt; 0.05

B) Tab.: Relative MMP-9-Protein-Expression.

Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) / Kontrolltier (Ko) (entsprechende Bande). Daten werden als Mittelwert ± SEM angegeben.

#### 4.2.2.2 proMMP-9-mRNA-Expression

Die MMP-9-mRNA-Expression wird in diesem Tiermodell nicht reguliert. Somit können die beobachteten Unterschiede im Proteingehalt nicht unmittelbar auf Veränderungen der Transkription zurückgeführt werden.

### **4.3 Kollagenasen : Einfluss des $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors auf die Expression und Aktivierung der Kollagenasen**

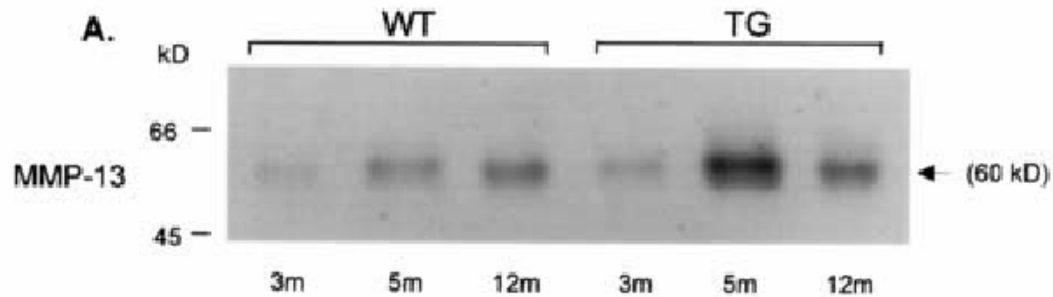
Die MMP-1 (Interstitielle Kollagenase) und MMP-13 (Kollagenase -3) spalten in hohem Maße tripel-helikale fibrilläre Kollagene wie Kollagen Typ I, II und III in zwei Fragmente, welche weiter zu Gelatinen abgebaut werden. Diese Kollagene sind sehr widerstandsfähig gegenüber Spaltung durch die meisten anderen Proteinasen.

#### **4.3.1 Regulation der MMP-13 im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1-AR-transgener Mäuse**

##### **4.3.1.1 MMP-13-Proteinexpression**

Der Proteingehalt der Kollagenase MMP-13 (60 kDa) ist signifikant erhöht auf das 2,5fache im hypertrophen Myokard (5 Monate alte  $\beta$ 1-AR-transgene Mäuse) infolge chronischer  $\beta$ 1-adrenerger Stimulation, fällt aber später wieder ab auf Wildtyp-Level im Alter von 1 Jahr mit dilatativer Kardiomyopathie und ausgeprägter Fibrose (MMP-13 OD /control: 3 Monate WT  $0,9 \pm 0,04$ , TG  $0,99 \pm 0,1$ ; 5 Monate WT  $1,86 \pm 0,22$ , TG  $3,66 \pm 0,3$ ; 12 Monate WT  $1,23 \pm 0,24$ , TG  $1,83 \pm 0,63$ ;  $n=6-7$ ;  $p<0.05$  für TG 3m vs. TG 5m, TG 5m vs. TG 12m, WT 5m vs. TG 5m und WT 3m vs. WT 5m). Der benutzte Antikörper (siehe Material/Methoden) detektiert sowohl die latente als auch die aktive Form der MMP-13 (sog. "murine Kollagenase"). Es kann jedoch weder in den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen noch in den Kontroll-Tieren aktive MMP-13 nachgewiesen werden (siehe repräsentativen Immunoblot), so dass die zunehmende Fibrose im Stadium der dilatativen Herzinsuffizienz nicht durch eine Abnahme der MMP-13-Aktivität erklärt werden kann – es erfährt nur die latente MMP-13 eine Abnahme der Proteinexpression. Auch scheint die MMP-13 einer altersabhängigen Regulation zu unterliegen (3mWT vs. 5mWT  $p<0.05$ ), was durch die Überexpression des  $\beta$ 1-AR zusätzlich verstärkt zu sein scheint (5mWT vs. 5mTG  $p<0.05$ ).

**Abb. 27: Immunoblot-Analyse der MMP-13 (sog. „murine“ Kollagenase)-Protein-Expression in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrolltieren (WT)**

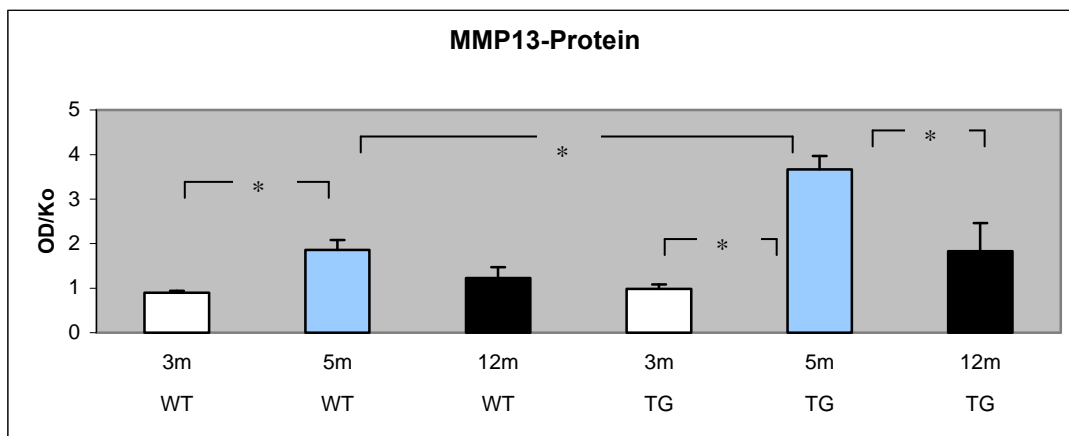


**Repräsentativer Westernblot der MMP-13 (Kollagenase 3):**

Gesamthomogenate von transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden für 5 min bei 95°C gekocht, mit 25 µg Protein/Spur auf einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem MMP-13-Antikörper (1: 400) inkubiert. Immunoreaktives Protein wird mittels ECL Chemolumineszenzreaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

**Abb. 28 : Quantifizierung der MMP-13 –Proteinexpression.**

**A)**



**B)**

MMP-13 Protein OD/Ko	3m	5m	12m
WT	0,9 ± 0,04 n=6	1,86 ± 0,22 n=7	1,23 ± 0,24 n=7
TG	0,99 ± 0,1 n=6	3,66 ± 0,3 n=7	1,83 ± 0,63 n=7

**A )** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung.

OD = optical density; \* =  $p < 0.05$

**B) Tab.:** Relativer MMP-13-Proteingehalt .

Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) im Verhältnis zum Kontrolltier (Ko) und entsprechende Bande. Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### 4.3.1.2 proMMP-13-mRNA-Expression

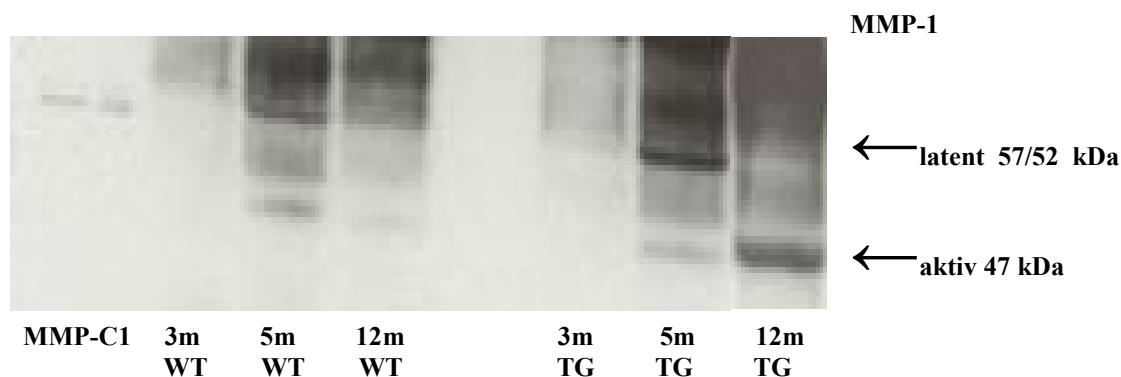
Die proMMP-13-mRNA-Expressionsbestimmung mittels Real-Time PCR ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen, so dass die beobachtete Regulation des MMP-13-Proteingehaltes nicht auf eine gesteigerte Transkription zurückgeführt werden kann.

#### 4.3.2 Regulation der MMP-1-Proteinexpression und –Enzymaktivität ( Interstitielle Kollagenase ) im linksventrikulären Gewebe β1-AR-transgener Mäuse

Zur Differenzierung der Kollagenasen untersuchen wir auch die interstitielle Kollagenase MMP-1, die Hauptkollagenase des menschlichen Herzens, die vor kurzem auch im murinen Gewebe nachgewiesen wurde. Der Antikörper detektiert sowohl die latente als auch die aktive Isoform. Es werden konzentrierte Gesamthomogenate benutzt für MMP-1 und die Gele außerdem mit 50 µg mehr beladen, da die Maus anscheinend weniger MMP-1 exprimiert als der Mensch. Die nicht-glykosylierte latente proMMP-1 (57/52 kDa)-Isoform wird in β1-AR-transgenen Mäusen im Alter von 5 Monaten um das 3,8 fache verstärkt exprimiert, verglichen mit gleichartigen Wildtyp-Kontrollmäusen, und nimmt in den 1-Jahr-alten Tieren wieder ab (MMP-1 latent OD/control: 3 Monate WT  $0,53 \pm 0,09$  , TG  $0,86 \pm 0,11$ ; 5 Monate WT  $2,49 \pm 0,09$  , TG  $4,03 \pm 1,42$ ; 12 Monate WT  $1,29 \pm 0,25$  , TG  $1,53 \pm 0,43$ ; n= 5-6; p<0.05 für TG3m vs. TG5m, TG5m vs. TG12m und WT5m vs. TG5m). Damit erfährt die latente MMP-1 eine ähnliche z.T. altersabhängige Regulation wie die MMP-13 (siehe 4.3.1).

Die aktive MMP-1 (47 kDa) nimmt hingegen parallel mit dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz in den transgenen Mäusen zu: 3fache Expression im Hypertrophiestadium (5 Monate) und 5fache Expression im Stadium der ventrikulären Dilatation in 1 Jahr alten β1-AR-transgenen Mäusen verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren (MMP-1 active OD/control: 3 Monate TG  $0,88 \pm 0,1$  , 5 Monate TG  $2,04 \pm 0,52$  , 12 Monate TG  $3,96 \pm 1$ ; WT 3m/ 5m / 12m  $0,82 \pm 0,09$ ; n= 5-6; p< 0.05 für TG 12m vs. TG 3m und WT 12m). Die Wildtyp-Tiere weisen nur ein relativ geringes unverändertes Aktivitäts-Level der MMP-1 auf.

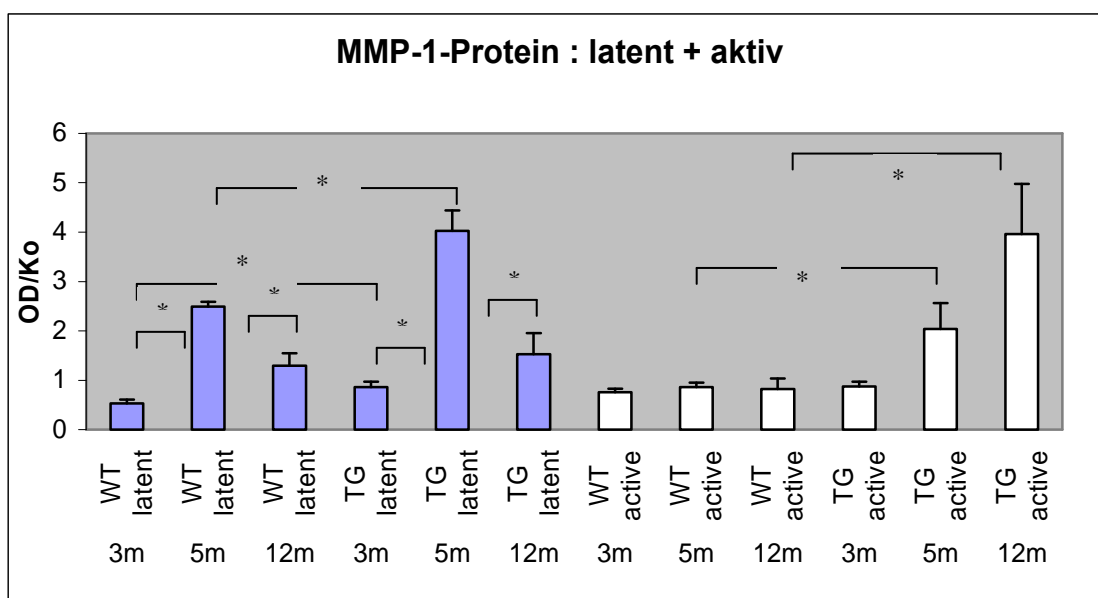
Abb. 29 : Immunoblot-Analyse der MMP-1 (Interstitielle Kollagenase)- Protein-Expression

**Repräsentativer Westernblot der MMP-1 (Interstitielle Kollagenase):**

Konzentrierte Gesamthomogenate von transgenen Mäusen im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden mit 50 µg Protein / Spur auf einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem MMP-1-Antikörper (1:1000) inkubiert. Immunoreaktives Protein wird mit ECL Chemolumineszenzreaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

Abb. 30: Relative MMP-1-Protein-Konzentration und -Aktivität

A)



B)

MMP-1 latent OD/Ko	3m	5m	12m
WT	0,53 ± 0,09 n=6	2,49 ± 0,09 n=6	1,29 ± 0,25 n=5
TG	0,86 ± 0,11 n=6	4,03 ± 0,42 n=6	1,53 ± 0,43 n=5



MMP-1 aktiv OD/Ko	3m	5m	12m
WT	0,77 $\pm$ 0,06 n=6	0,87 $\pm$ 0,09 n=6	0,82 $\pm$ 0,22 n=5
TG	0,88 $\pm$ 0,1 n=6	2,04 $\pm$ 0,52 n=6	3,97 $\pm$ 1,01 n=5

**A )** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung:

Latente + aktive Form der MMP-1 (latente MMP-1 (57/52 kDa); aktive MMP-1 (47 kDa) )

OD= optical density; \* =  $p < 0.05$

**B ) Tab.:** Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) im Verhältnis zur MMP-C1 als Kontrolle. Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

Die proMMP-1-mRNA-Expressionsbestimmung mittels Real-Time PCR ergibt ähnlich der MMP-13-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen.

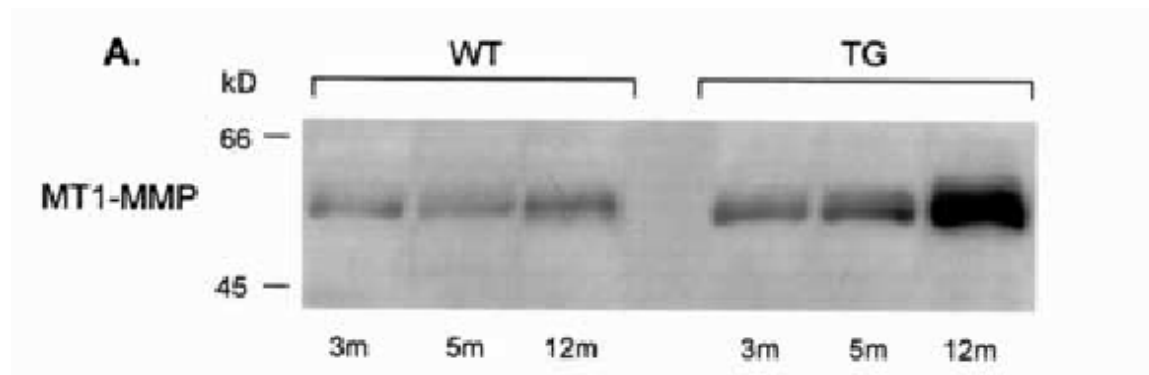
#### **4.4 Regulation der MT1-MMP ( Membrane type-1 matrix metalloproteinase , MMP-14 ) im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1-AR-transgener Mäuse**

Die MT-MMPs sind proteolytisch aktiv, sobald sie in die Zellmembran integriert werden. Die MT1-MMP (Membrane type-1 matrix metalloproteinase) ist an der proteolytischen Weiterverarbeitung der proMMP-2 beteiligt und unterliegt in nur geringem Maße den lokal inhibitorischen Effekten der TIMPs.

##### **4.4.1 MT1-MMP-Proteinexpression**

Untersuchungen mittels Immunoblots zeigen eine signifikante Zunahme in der MT1-MMP (58 kDa)-Protein-Konzentration im linksventrikulären Homogenat der 12 Monate alten transgenen Mäuse mit Herzinsuffizienz. Eine Erhöhung der Proteinexpression fehlt in transgenen Mäusen mit normaler Myokard-Struktur (Alter: 3 Monate) und im hypertrophen Myokard (Alter: 5 Monate), auch bleibt das MT1-MMP-Expressionsniveau in den Wildtyp-Kontrolltieren in allen Altersgruppen unverändert (MT1-MMP OD/control: 3 Monate WT 0,32  $\pm$  0,03 , TG 0,3  $\pm$  0,03; 5 Monate WT 0,53  $\pm$  0,11 , TG 0,48  $\pm$  0,07; 12 Monate WT 0,6  $\pm$  0,15 , TG 1,16  $\pm$  0,13; n= 5-6;  $p < 0.05$  für 12mTG vs. 12mWT, 3mTG vs. 5mTG, 5mTG vs. 12mTG).

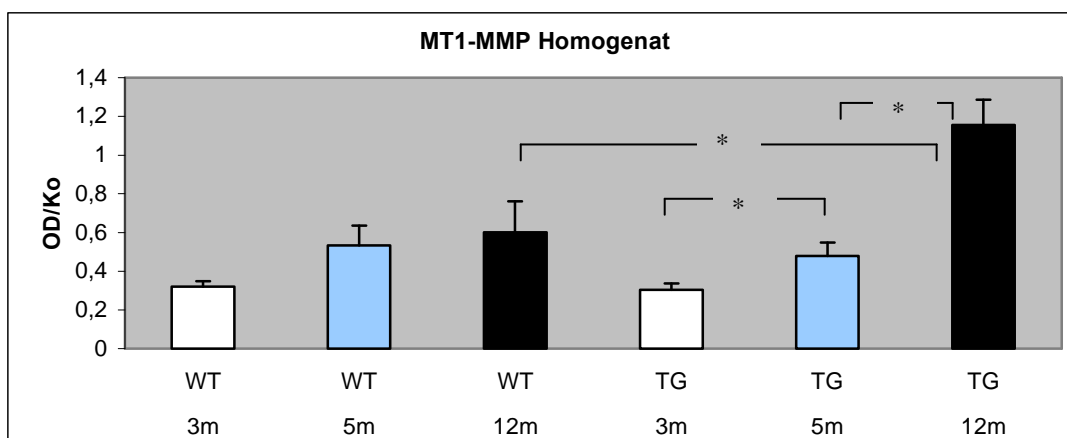
Abb. 31: Immunoblot-Analyse der MT1-MMP (MMP-14) –Protein-Expression

**A) Repräsentativer Westernblot der MT1-MMP (MMP-14):**

Gesamthomogenate von transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden bei 95°C für 5 min gekocht und mit 25 µg Protein/ Spur auf einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem MT1-MMP-Antikörper (1: 1000) inkubiert. Immunreaktives Protein wird mittels ECL Chemolumineszenz-Reaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

Abb. 32 : Quantifizierung der MT1-MMP-Proteinexpression

A)



B)

MT1-MMP Protein	3m	5m	12m
WT	0,32 ± 0,03 n=6	0,53 ± 0,1 n=6	0,6 ± 0,16 n=5
TG	0,3 ± 0,03 n=6	0,48 ± 0,07 n=6	1,16 ± 0,13 n=5

**A) Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung:**

OD=optical density; \* =  $p < 0.05$

Die densitometrische Quantifizierung der MT1 -(membrane-type-1)-MMP-Protein-Expression (Immunoblot) von  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp (WT)- Mäusen ergibt eine 2fache Erhöhung in TG-Mäusen mit schwerer Herzinsuffizienz (12 Monate alte transgene Mäuse) ggn. 1 Jahr alten Wildtyp-Tieren und eine insgesamt 3,8fachen Erhöhung ggn. jungen transgenen Tieren. Die MT1-MMP-Expression in den Wildtyp-Tieren bleibt durchweg unverändert.

**B) Tab.: Relativer MT1-MMP-Protein-Gehalt.**

Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) im Verhältnis zu einem Kontrolltier (Ko).

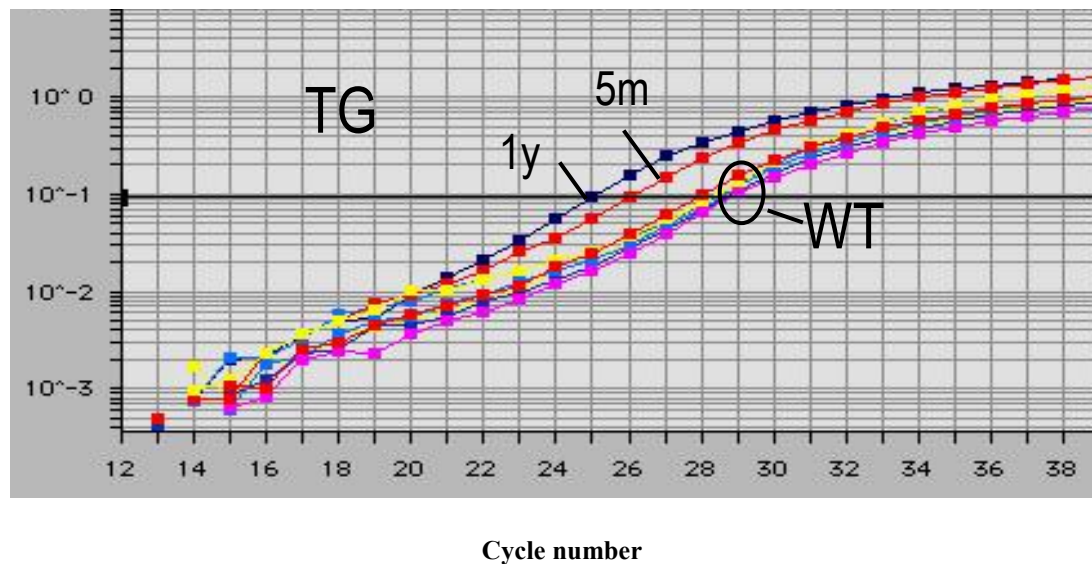
Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### 4.4.2 MT1-MMP-mRNA-Expression

Die Ergebnisse der Proteinexpression werden untermauert von einer mehr als 2-3 fachen Erhöhung des Transkriptions-Levels der MT1-MMP-mRNA in den 1 Jahr alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen, gemessen durch quantitative RT-PCR ( $p < 0.05$  für 12mTG vs. 12mWT und 12mTG vs. 3mTG).

Abb. 33 : TaqMan-quantitative Real-Time PCR von proMT1-MMP

$\log \Delta R_n$

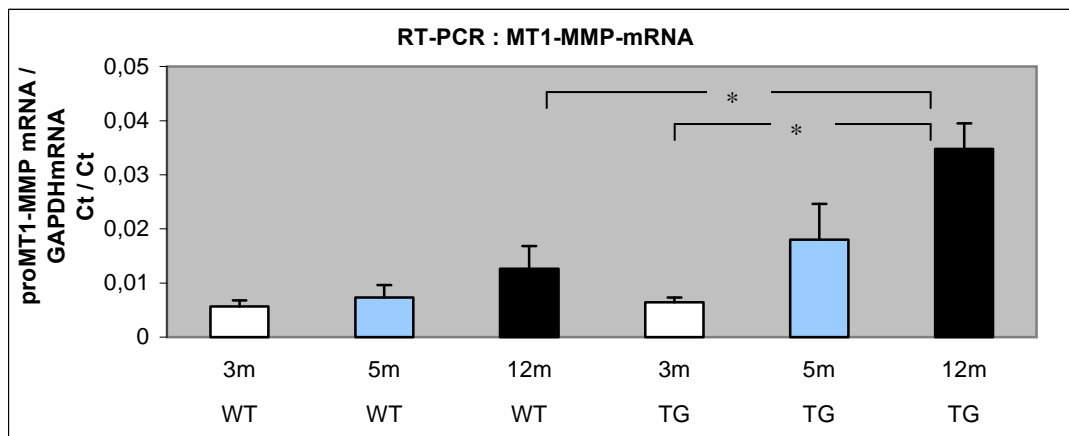


TaqMan-Amplifikationsplot von repräsentativen  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtypmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) für MT1-MMP-mRNA. Die Amplifikationskurve der 3mTG-Mäuse liegt im Bereich der Wildtyp-Tiere.

$R_n$  = normalized reporter signal

Abb. 34 : Quantifizierung der MT1-MMP-mRNA-Expression

A)



B)

MT1-MMP mRNA Ct/Ct	3m	5m	12m
WT	0,006 ± 0,001 n=5	0,007 ± 0,002 n=6	0,013 ± 0,004 n=4
TG	0,006 ± 0,001 n=5	0,018 ± 0,007 n=5	0,035 ± 0,005 n=4

**A) TaqMan-RT-PCR für MT1-MMP-mRNA:**

Quantifizierung der mRNA-Expression von MT1-MMP in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m). Die Threshold cycle (Ct)-Werte werden dargestellt als Verhältnis von proMT1-MMP-mRNA zu GAPDH-mRNA (als Housekeeping-Gen). \* =  $p < 0,05$

**B) Tab.:** Relative proMT1-MMP-mRNA-Konzentrationen (proMT1-MMP mRNA/GAPDH mRNA). Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 4.5 Regulation der TIMPs (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)

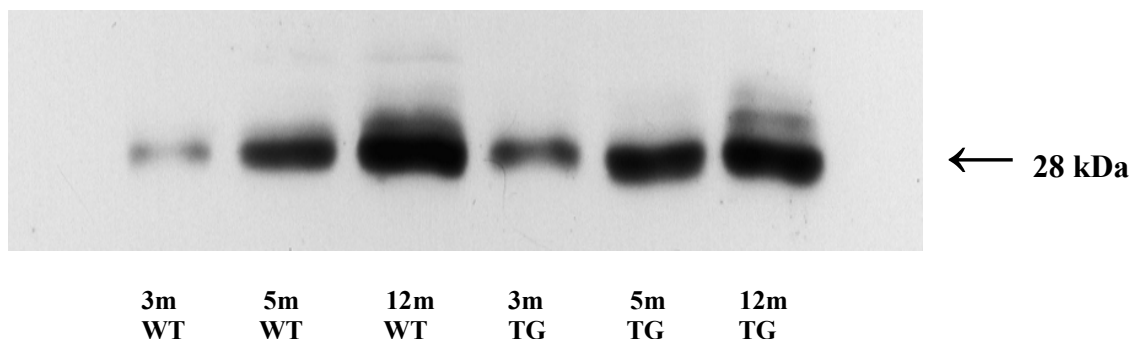
### 4.5.1 Regulation von TIMP-1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1) im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1-AR-transgener Mäuse

Die TIMPs inhibieren die enzymatische Aktivität der MMPs. Sie bilden nicht-kovalente Komplexe mit dem Zink-bindenden aktiven Zentrum der MMPs und inhibieren die MMPs in einem molaren Verhältnis von 1:1. TIMP-1 inhibiert die Aktivität der meisten MMPs, mit Ausnahme der MMP-2 und der MT1-MMP.

#### 4.5.1.1 TIMP-1-Proteinexpression

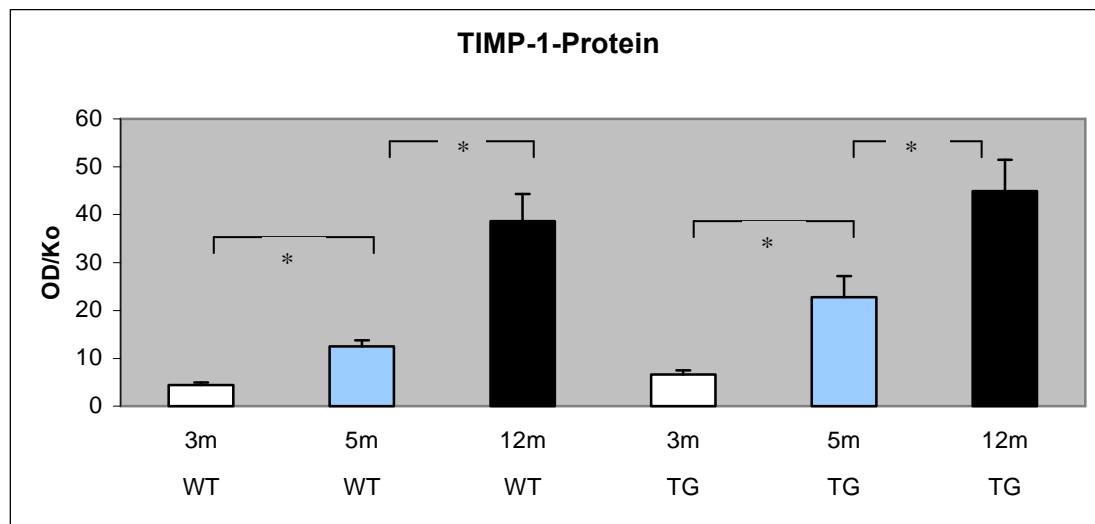
Die Protein-Expression von TIMP-1 (28 kDa) erhöht sich mit zunehmendem Alter sowohl in den Wildtyp-Tieren als auch in den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen, wobei aber kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen transgenen Gruppe und Kontroll-Gruppe beobachtet werden kann (TIMP-1 OD/control: 3 Monate WT  $4,37 \pm 0,56$  , TG  $6,59 \pm 0,87$ ; 5 Monate WT  $12,53 \pm 1,22$  , TG  $22,79 \pm 4,35$ ; 12 Monate WT  $38,62 \pm 5,67$  , TG  $44,86 \pm 6,6$ ;  $n = 5-8$ ;  $p < 0.05$  für 3mWT vs. 5mWT, 5mWT vs. 12mWT, 3mTG vs. 5mTG, 5mTG vs. 12mTG). Diese Daten suggerieren eine wichtige Rolle von TIMP-1 hinsichtlich der endogenen Kontrolle der kardialen MMP-1 und MMP-13-Aktivität (Kollagenasen-Aktivität), wie auch der MMP-9 (Gelatinase B). Der Alterungsprozess im allgemeinen scheint ein Hauptgrund zu sein für erhöhte TIMP-1-Proteinexpression.

**Abb. 35 : Immunoblot-Analyse der TIMP-1-Protein-Expression**



##### A) TIMP-1: Repräsentativer Westernblot

Gesamthomogenate von transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden bei 95°C für 5 min gekocht und mit 25  $\mu$ g Protein/ Spur auf einem 25% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem TIMP-1-Antikörper (1:1000) inkubiert. Immunoreaktives Protein wird mittels ECL Chemolumineszenz-Reaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

**Abb. 36 : Quantifizierung der TIMP-1-Proteinexpression****A)****B)**

TIMP-1 –Protein OD/Ko	3m	5m	12m
WT	4,38 ± 0,57 n=6	12,53 ± 1,22 n=6	38,62 ± 5,67 n=8
TG	6,59 ± 0,87 n=5	22,8 ± 4,35 n=7	44,86 ± 6,6 n=7

**A)** Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung.

OD =optical density; \* = p &lt; 0.0

Die TIMP-1-Protein-Expression ist verstärkt in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen und Wildtyp -Tieren (TG vs. WT n.s.) als Hinweis auf eine altersabhängige Regulation.**B) Tab.:** Relativer TIMP-1-Proteingehalt .

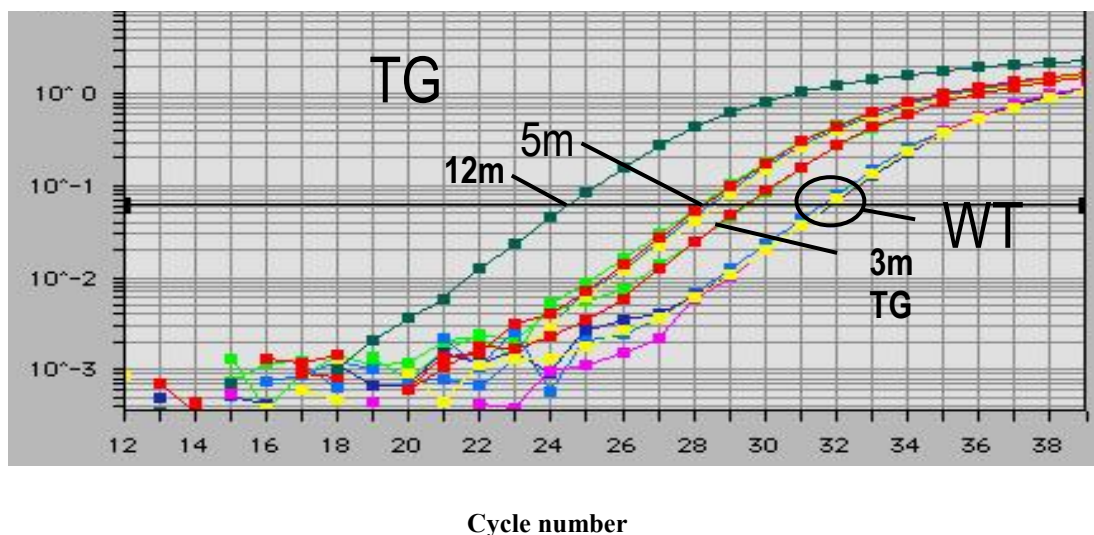
Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) im Verhältnis zum Kontroll-Tier (Ko).

Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### 4.5.1.2 TIMP-1-mRNA-Expression

Die TIMP-1 mRNA-Transkription ist mit zunehmendem Alter und zunehmender Herzinsuffizienz erhöht. Eine Altersabhängigkeit konnte aber für die Wildtypiere nicht gezeigt werden ( $p < 0.05$  für 5mWT vs. 5mTG, 12mWT vs. 12mTG, 5mTG vs. 12mTG, 3mTG vs. 12mTG). Der hohe TIMP-1-Protein-Gehalt in den Wildtyp-Mäusen ist somit nicht durch eine Verstärkung der Transkription bedingt, auch scheint die erhöhte TIMP-1-mRNA-Expression in den 1 Jahr alten  $\beta$ 1-AR-Transgenen den TIMP-1-Proteingehalt nicht maßgeblich zu beeinflussen.

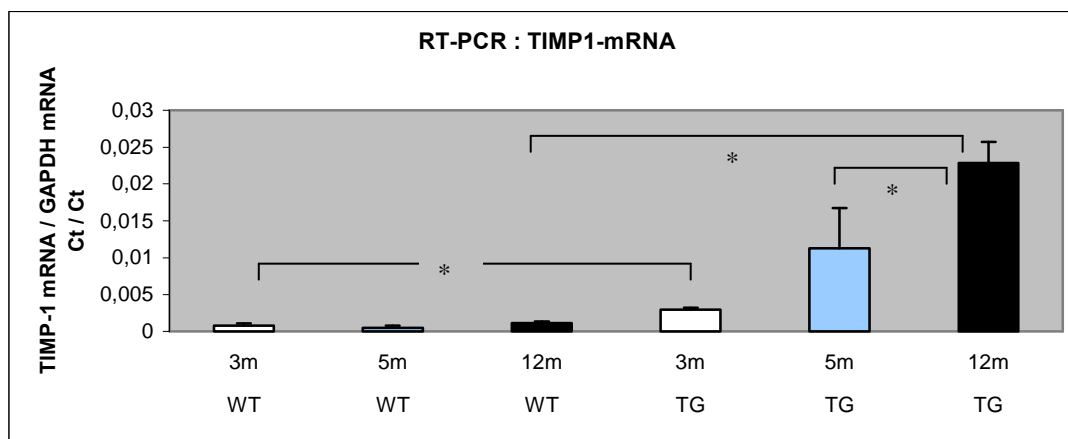
Abb. 37: TaqMan-quantitative Real-Time PCR von TIMP-1-mRNA

log $\Delta R_n$ 

TaqMan –Amplifikationsplot von repräsentativen  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtypmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) für TIMP-1-mRNA  
 Rn = normalized reporter signal

Abb. 38 : Quantifizierung der TIMP-1-mRNA-Expression

A)



B)

TIMP-1-mRNA Ct/Ct	3m	5m	12m
WT	0,0008 $\pm$ 0,0003 n=4	0,0005 $\pm$ 0,0003 n=4	0,0011 $\pm$ 0,0002 n=4
TG	0,0029 $\pm$ 0,0003 n=5	0,0113 $\pm$ 0,0054 n=3	0,0228 $\pm$ 0,0029 n=4

**A) TaqMan-RT-PCR für TIMP-1-mRNA:**

Quantifizierung der mRNA-Expression von TIMP-1 in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m).

Die Threshold cycle (Ct)-Werte werden dargestellt als Verhältnis von TIMP-1 mRNA zu GAPDH mRNA (als Housekeeping-Gen).

Die mRNA-Expression ist ausschließlich in  $\beta$ 1-AR-transgenen-Mäusen mit progressiver Herzerkrankung signifikant erhöht.

**B) Tab.:** Relative TIMP-1-mRNA-Konzentrationen (TIMP-1 mRNA /GAPDH mRNA).  
Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

#### **4.5.2 Regulation von TIMP-2 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2) im linksventrikulären Gewebe $\beta$ 1-AR- transgener Mäuse**

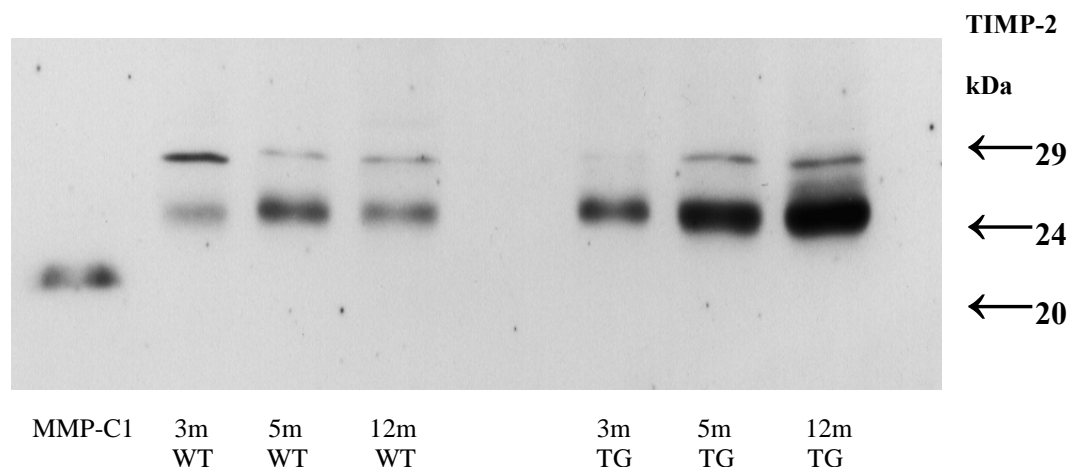
TIMP-2 ist für seine inhibitorische Wirkung der MMP-2 bekannt. Es kann aber auch zur pro-MMP-2-Aktivierung beitragen in Abhängigkeit von der Protein-Konzentration. In dieser Arbeit zeigt TIMP-2 ein ähnliches Expressionsmuster wie MMP-2 und MT1-MMP. Die gleichsinnige Regulation von TIMP-2 könnte ein Hinweis sein für eine Beteiligung von TIMP-2 an der MMP-2-Aktivierung.

##### **4.5.2.1 TIMP-2-Proteinexpression**

Die TIMP-2 (24 kDA) –Protein-Konzentration und die –mRNA-Expression nehmen in den transgenen Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen gleichen Alters kontinuierlich zu (TIMP-2 OD/control: 3 Monate WT  $2,02 \pm 0,46$  , TG  $2,99 \pm 0,83$ ; 5 Monate WT  $6,97 \pm 0,98$  , TG  $7,97 \pm 1,37$ ; 12 Monate WT  $6,07 \pm 1,31$  , TG  $12,22 \pm 1,21$ ; n= 5-8;  $p < 0,05$  für TG 3m vs. TG 12m und WT 12m vs. TG 12m). TIMP-2 wird somit als Folge der chronischen sympathischen Stimulation mit zunehmender kardialer Dysfunktion verstärkt exprimiert. Aus den vorliegenden Daten ist keine Beeinflussung der TIMP-2-Expression durch den Alterungsprozess ersichtlich (im Gegensatz zu TIMP-1, siehe 4.5.1).

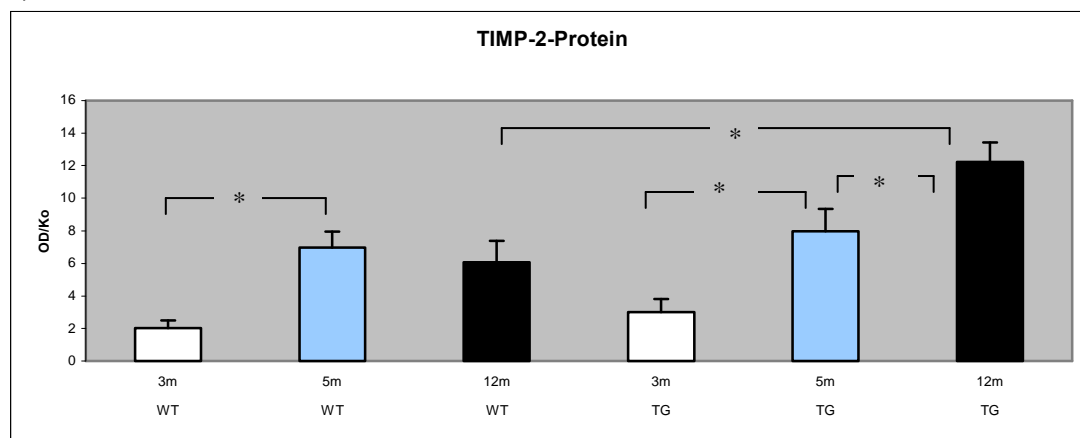


Abb. 39 : Immunoblot-Analyse der TIMP-2-Protein-Expression

**A) TIMP-2-Protein : Repräsentativer Westernblot :**

Gesamthomogenate von transgenen Mäusen (TG) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m) und altersentsprechenden Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) werden bei 95°C für 5 min gekocht und mit 25 µg Protein/ Spur auf einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit monoklonalem TIMP-2-Antikörper (1:1000) inkubiert. Immunoreaktives Protein wird mittels ECL Chemolumineszenz-Reaktion (Amersham) sichtbar gemacht.

Abb. 40 : Quantifizierung der TIMP-2-Proteinexpression

**A)****B)**

TIMP-2-Protein OD/Ko	3m	5m	12m
WT	2,03 ± 0,46 n=5	6,97 ± 0,98 n=6	6,07 ± 1,31 n=6
TG	3 ± 0,83 n=5	7,97 ± 1,38 n=7	12,22 ± 1,21 n=8

**A) Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden normalisiert auf Proteinbeladung.**

OD=optical density ; \* = p < 0.05

TIMP-2 -Gesamtexpression auf Protein-Ebene gemessen durch WesternblotAnalyse:

Kontinuierliche Zunahme mit Krankheitsprogression. Die höchsten Levels wurden in 12 Monate alten Mäusen mit schwerer Herzinsuffizienz gemessen.

**B) Tab.: Relativer TIMP-2-Proteingehalt.**

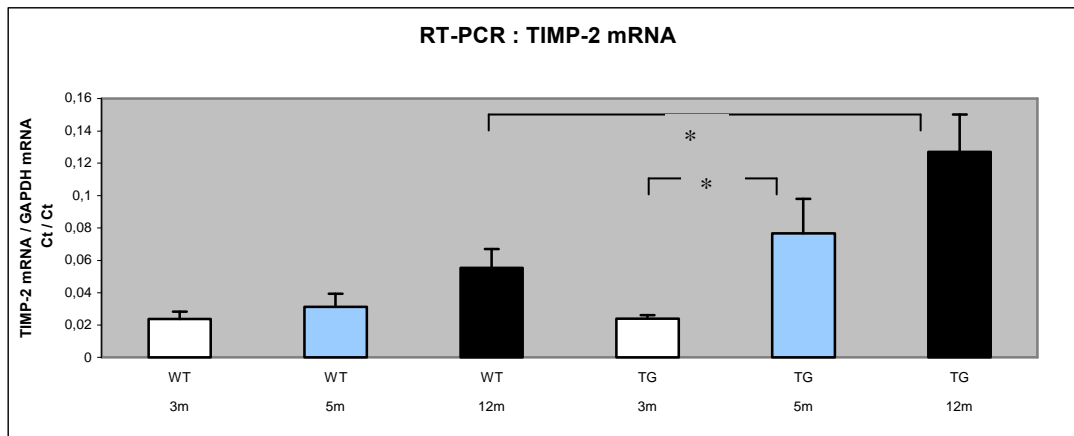
Werte werden dargestellt als densitometrische Einheiten (OD) im Verhältnis zum Kontrolltier (Ko). Daten werden als Mittelwert ± SEM angegeben.

#### 4.5.2.2 TIMP-2-mRNA-Expression

Real-time PCR-Untersuchungen zeigen erhöhte TIMP-2 mRNA- Expressionslevel als Folge der chronisch sympathischen Stimulation in den  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen.

**Abb. 41 : Quantifizierung der TIMP-2-mRNA-Expression**

**A)**



**B)**

TIMP-2- mRNA	3m	5m	12m
WT	0,02 ± 0,01 n=5	0,03 ± 0,01 n=6	0,06 ± 0,01 n=4
TG	0,02 ± 0,002 n=5	0,08 ± 0,02 n=6	0,13 ± 0,02 n=3

**A ) TaqMan-RT-PCR für TIMP-2 mRNA:**

Quantifizierung der mRNA-Expression von TIMP-2 in  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen (TG) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) im Alter von 3 Monaten (3m), 5 Monaten (5m) und 12 Monaten (12m). Die Threshold cycle (Ct)-Werte werden dargestellt als Verhältnis von TIMP-2-mRNA zu GAPDH-mRNA (als Housekeeping- Gen). \* =  $p < 0.05$

**B) Tab.:** Relative TIMP-2-mRNA-Konzentrationen (TIMP-2 mRNA/GAPDH mRNA).

Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 5. Diskussion

### 5.1. Neuroendokrine Aktivierung und interstitielles Remodelling

In der vorliegenden Arbeit wurde das interstitielle Remodelling anhand von  $\beta 1$ -AR-überexprimierenden transgenen Mäusen (Engelhardt et al., 1999) untersucht. Unsere Ergebnisse belegen, dass  $\beta$ -adrenerge Überaktivität durch  $\beta$ -Adrenorezeptor-Überexpression von interstitiellem Matrix-Remodelling und -Umbau durch Induktion von MMP/TIMP-Aktivität parallel zu den kardialen Phänotyp-Veränderungen begleitet wird.

In den  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen ist anfangs eine Zunahme der kardialen Pumpfunktion zu verzeichnen gefolgt von ventrikulärer Hypertrophie im Alter von 5 Monaten. Der Übergang von kompensierter linksventrikulärer Hypertrophie zu linksventrikulärer Dilatation und Dysfunktion findet in diesem transgenen Mausmodell zwischen 5 und 9 Monaten statt. Die linksventrikuläre Dysfunktion erfährt die größte Ausprägung in 12 Monate alten  $\beta 1$ -AR-transgenen Tieren (Engelhardt et al., 1999 und 2001). Wie anhand der Expressionsuntersuchungen (Histologie, Real-Time-PCR, Immunoblotting) und anhand der Enzymaktivitätsassays (Zymographie) hier gezeigt werden konnte, entwickeln die  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäuse eine zunehmende interstitielle Fibrose, welche der funktionellen kardialen Verschlechterung vorausgeht. Die myokardiale Fibrose ist in 12 Monate alten  $\beta 1$ -AR-transgenen Mäusen am deutlichsten.

Die Arbeitsgruppe um Bisognano (Bisognano et al., 2000) untersuchte ein weiteres transgenes Mausmodell der Stammlinie FVB/N, welches den humanen  $\beta 1$ -AR mit Hilfe des  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain (MHC)- Promotors im Myokard überexprimiert. In diesen Mäusen betrug die  $\beta 1$ -AR-Protein- Expression das ca. 24-46-fache derer von Wildtyp-Mäusen. In der histopathologischen Untersuchung von jungen (4 Monate)

und alten (> 9 Monate) transgenen Mauserherzen wurden durchgehend große Bereiche von interstitieller Ersatzfibrose und eine ausgeprägte Myocyten-Hypertrophie nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression des prä-apoptotischen Markers “bax” beobachtet, die mit Fibrose-Regionen ko-lokalisiert war. Die noch stärkere Überexpression des  $\beta$ 1-AR wirkte sich, verglichen mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten transgenen Mäusen, auf die Überlebensrate aus: nur zwei Mäuse wurden älter als 9 Monate (Bisognano et al., 2000). Es ist bekannt, dass Noradrenalin die Apoptose in adulten Rattenmyocyten über  $\beta$ -adrenerge Signalwege stimuliert (Communal et al., 1998), zusätzlich einen komitogenen Effekt auf kultivierte kardiale Fibroblasten der Ratte ausübt (Leicht et al., 2000) und zum Fortschreiten kompensierter LV-Hypertrophie zur Ventrikeldilatation führt (Badenhorst et al., 2003). Anhaltende Stimulation oder eine Überexpression von kardialen  $\beta$ 1-AR führt somit zu Hypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz/Herzversagen, eine Blockade von  $\beta$ -AR mit verschiedenen Antagonisten - Bisoprolol, Carvedilol, Metoprolol - verbessert das Überleben von Herzinsuffizienz-Patienten (CIBIS II 1999; MERIT-HF 1999; Bristow et al., 2000; Packer et al., 2001).

Welche Signaltransduktionsprozesse des  $\beta$ 1-adrenergen Signaltransduktionsweges entscheidend für die Auslösung der beobachteten stadienabhängigen Regulation der MMPs und TIMPs während der Herzinsuffizienzentwicklung sind, ist trotz einer Vielfalt an Daten und Hypothesen noch nicht geklärt (Engelhardt et al., 2001 und 2002; Spindler et al., 2003; Lohse et al., 2003). Die  $\beta$ -AR/Adenylatcyclase/PKA-Achse wird klassischerweise als Signalkaskade angesehen, mit cAMP als den verantwortlichen Second Messenger verantwortlich für die positiv inotropen, chronotropen und lusitropen Effekte der Katecholamine. Neue Daten, gewonnen anhand von transgenen Tieren, die verschiedene Elemente dieser Achse exprimieren, zeigen aber, dass dieses System einen weitaus komplexeren Aufbau aufweist als ursprünglich angenommen. Eine Überexpression der alpha-Untereinheit von Gs verursacht beispielsweise einen Phänotyp ähnlich dem der  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäuse und ist anfangs charakterisiert durch eine erhöhte Ansprechbarkeit auf Katecholamine,

später jedoch durch Myocyten-Hypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz (Iwase et al., 1996; Antos et al., 2001; Lohse et al., 2001). Engelhardt et al. haben zudem gezeigt, dass die beeinträchtigte myokardiale Kontraktilität in den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen mit einer veränderten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase assoziiert ist (Engelhardt et al. 1999 und 2001). Vor kurzem wurde außerdem der kardiale  $\text{Na}^{+}$ - $\text{H}^{+}$ -Austauscher (NHE1) als neuer Mediator der adrenerg induzierten Herzinsuffizienz identifiziert (Engelhardt et al., 2002). Die Inhibition des NHE1 verhinderte die Entstehung einer Herzinsuffizienz in  $\beta$ 1-AR transgenen Mäusen. Daraus kann geschlossen werden, dass u.a. der kardiale  $\text{Na}^{+}$ - $\text{H}^{+}$ -Austauscher 1 für die negativen kardialen Effekte der chronischen  $\beta$ 1-AR-Stimulation des Herzens von Bedeutung ist. In dem Bemühen Gemeinsamkeiten in der pathologischen Genexpression zwischen den verschiedenen Modellen mit verstärkter  $\beta$ -adrenerger Signalvermittlung und  $\beta$ -AR-induzierter Kardiomyopathie zu identifizieren, führten Gaussin et al. (2003) ein Screening von Mäusen durch, die Gsa,  $\beta$ 1AR,  $\beta$ 2AR, oder die Protein Kinase A überexprimieren, und fanden verschiedene Kandidat-Gene. Ob diese Gene die ihnen zugedachte Bedeutung haben, bleibt abzuwarten (Gaussin et al., 2003).

Das interstitielle Remodelling ist neben myozytären Prozessen ein wichtiger Mechanismus in Phänotypveränderungen bei Kardiomyopathien. Der Kollagen-Umbau ist durch die proteolytische Aktivität der MMPs und durch deren endogenen Inhibitoren (TIMPs) reguliert. Hinweise über eine Einflussnahme des  $\beta$ -adrenergen Systems auf die MMP-Regulation wurden schon früher erbracht. Vor kurzem wurde gezeigt, dass auch Myocyten MMPs synthetisieren und freisetzen. Es wurde vorgeschlagen, dass Myocyten somit am interstitiellen Remodelling teilnehmen (Coker et al., 2001). Im vorliegenden Mausmodell wird die zunehmende interstitielle Fibrose von einem erhöhten Expressionsgrad von proMMP-2, MMP-2, TIMP-2 und membrangebundener MT1-MMP (MMP-14), und von Kollagen-Typ-I abbauenden Enzymen wie MMP-1 und MMP-13 begleitet. Zunehmende MMP-Aktivität konnte mehrfach sowohl anhand von Tierstudien als auch am Menschen mit Herzinsuffizienz und ventrikulärer Dilatation und Fibrose nachgewiesen werden (Li et al., 1998; Mujumdar et al., 1999; Seeland et al., 2002; Spinale et al., 1998). Auch in diesen

Modellen wurde eine zunehmende Myokardfibrose beobachtet. Diese Daten und die hier vorgestellten liefern Hinweise auf eine Dysbalance zwischen Aufbau und Abbau des interstitiellen fibrösen Gewebes bei Kardiomyopathien.

In der vorliegenden Arbeit geht der Entwicklung einer ventrikulären Dilatation eine erhöhte linksventrikuläre Proteinexpression von pro-MMP-Isoformen, wie den Kollagenasen (MMP-1, MMP-13), den Gelatinasen (proMMP-2 und proMMP9) und der membrangebundenen MT1-MMP bei 5 Monate alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen voraus. Die kompensierte Hypertrophie ist zusätzlich mit erhöhten myokardialen TIMP-1 und TIMP-2-Konzentrationen assoziiert, was eine reduzierte Kollagenasen-Aktivität impliziert: Es kann keine Aktivierung der MMP-13 (Kollagenase-3) und nur eine geringe Aktivität der MMP-1 (Interstitielle Kollagenase) nachgewiesen werden. Dies stimmt mit dem Konzept überein, dass verringerte myokardiale Kollagenasen-Aktivität die Kollagen-Akkumulation bei sich entwickelnder Hypertrophie erleichtert (Li et al., 2000; Mujumdar et al., 1999).

Bei  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen erweist sich die pro-Kollagen-Typ-I und -III mRNA und die interstitielle Kollagen-Protein-Expression als 4fach verstärkt im Alter von 5 Monaten und auf schließlich dem 17fachen erhöht im Alter von 12 Monaten (verglichen mit den 3 Monate alten Tieren). Das Herzgewicht nimmt bei 5 Monate alten transgenen Mäusen um 10 % zu und zeigt auch in den 1 Jahr alten Mäusen keine weitere signifikante Zunahme. Da keine weitere Zunahme des Herzgewichtes an diesen Mäusen mit schwerer Herzinsuffizienz registriert wird, verglichen mit den 5 Monate-transgenen, weist dies auf apoptotische Vorgänge (Myocytenuntergang) und Ersatzfibrose hin. Wir beobachten bei 5 Monate alten  $\beta$ 1-TG mit kompensierter Herzhypertrophie eine zunehmende Ablagerung von Typ-I und Typ-III-Kollagen-Fibrillen (Polarisationsmikroskop), die die Myozyten umgeben. In den 12 Monate alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Gruppe sieht man eine asymmetrische Verteilung von Kollagen-Fibrillen mit Ruptur der Kollagen-Netzwerk-Struktur in Sirius-Rot-gefärbten Ausschnitten des linken Ventrikels im Sinne einer interstitiellen Fibrose als führender Aspekt des kardialen Phänotypes der 1 Jahr alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäuse

mit schwerer Herzinsuffizienz. Die interstitielle Kollagen-Ablagerung ist stärker ausgeprägt als die perivaskuläre Fibrose. Die Verschiebung von Kollagen Typ I zu Typ III, die mit der ventrikulären Dilatation oft assoziiert wird (Mukherjee et al., 1990 und 1991; Spinale et al., 1996), kann in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Entsprechend den in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene gemachten Beobachtungen stellte auch die Arbeitsgruppe um Briest und Zimmer (Briest et al., 2001) eine Erhöhung der mRNAs von Collagen I und III, MMP-2 und TIMP-2 in Noradrenalin-behandelten Ratten fest. Außerdem kam es zu einer Erhöhung der Aktivität von MMP-2 in Ratten, die eine kontinuierliche i.v.-Infusion mit Noradrenalin erhielten. Die Langzeitbehandlung mit NA induzierte eine 37% Erhöhung der interstitiellen Fibrose assoziiert mit Hypertrophie. Die Autoren vermuteten damals, dass die erhöhte MMP-2-Aktivität notwendig ist für die extrazelluläre Matrix zur Adaptation auf die Vergrößerung der Myocyten. Das Verhältnis von myokardialem Kollagen Typ I zu Typ III war in den NA-behandelten Ratten im Gegensatz zu anderen bisherigen Berichten (siehe oben) nicht verändert, entsprechend den  $\beta$ 1-Adrenozeptor-transgenen Mäusen in der vorliegenden Arbeit. Weitere Arbeitsgruppen beobachteten, dass unabhängig von Veränderungen der myokardialen Kollagen-Konzentration eine Abnahme des Kollagen-Cross-Linking mit linksventrikulärer Dilatation einherging, und zwar in einem Rattenmodell mit Druckbelastung und Herzinsuffizienz mit LV-Dilatation induziert durch 7 Monate lange  $\beta$ -AR-Stimulation mit Isoproterenol (Spinale et al., 1996; Woodiwiss et al., 2001). Diese Daten untermauern wiederum die Verbindung zwischen neurohormonaler Stimulation und dem Kollagen-Turnover.

## **5.2 Gelatinasen**

### **5.2.1 MMP-2-Aktivierung mittels des MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2-Tertiärkomplexes**

$\beta$ 1-TG-Mäuse entwickeln eine Ventrikeldilatation und eine symptomatische

Herzinsuffizienz im Alter von 12 Monaten (Engelhardt et al 1999). Die Gesamt-Kollagenasen-Protein-Expression (MMP-1, MMP-13) nimmt in den 12 Monaten alten Tieren ab, aber die membrangebundene MT1-MMP (MMP-14), TIMP-2-Protein-Expression und die MMP-2-Gelatinasen-Aktivität erhöht sich signifikant in  $\beta$ 1-TG-Mäusen im Alter von 5 Monaten und weiter im Alter von 12 Monaten. Wir sehen ein schwaches zymographisches MMP-2-Aktivitätssignal in den  $\beta$ 1-TG-Mäusen mit 5 Monaten, dem Übergang zur Ventrikeldilatation vorausgehend. Die gelatinolytische MMP-2-Aktivität, gemessen durch Gelatine-Zymographie, erhöht sich auf das 3,6fache bei  $\beta$ 1TG mit dekompensierter Herzinsuffizienz im Alter von 12 Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Aktivierung der MMP-2-Gelatinase mit linksventrikulärem Remodelling und Dilatation einhergeht.

Sakata et al. lieferten schon 2004 den Beweis, dass gelatinolytische Aktivität der LV-Dilatation vorausgeht (Sakata et al., 2004). Iwanaga et al. (2002) konnten anhand von Dahl Salz-sensitiven Ratten mit kompensierter LV-Hypertrophie (11 Wochen) noch keine Veränderungen im Hypertrophie-Stadium nachweisen, aber erhöhte MMP-2 mRNA, -Protein-Gehalt und -Aktivität, genauso wie erhöhte TIMP-2-Protein und -mRNA-Konzentrationen nach Entwicklung von Dilatation und Dysfunktion (Iwanaga et al., 2002). Eine gezielte Deletion des MMP-2-Gens reduzierte die LV-Ruptur und das späte Remodelling in Mäusen nach Myokardinfarkt (Hayashidani et al., 2003). Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Hypothese, dass die MMP-2 (Gelatinase A) eine Schlüsselrolle spielt im Rahmen des linksventrikulären Remodellings und der kardialen Dilatation mit Dysfunktion.

Coker et al. (2001) haben in linksventrikulären Myocytenpräparationen von Schweinen gezeigt, dass die Stimulation mit Endothelin -1, Angiotensin II und Isoproterenol die MMP (MMP-2 und MT1-MMP)-Synthese und Freisetzung beeinflusst (Coker et al., 2001). Dies weist auf eine wahrscheinliche Hauptrolle der Myocyten, zumindest was die MMP-2- und die MT1-MMP-Synthese anbetrifft, auch in unserem transgenen Mausmodell hin. Welcher Zelltyp für die Kollagenproduktion und die Ersatzfibrose



und auch für die jeweils beobachtete MMP- und TIMP-Produktion verantwortlich ist im vorliegenden  $\beta$ 1-AR-transgenen Mausmodell, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht und man kann trotz der den  $\beta$ 1-AR-überexprimierenden Myocyten auch keine eindeutige Aussage hierüber treffen.

Es ist bekannt, dass die Membran-verknüpfte MMP MT1-MMP an der Zellmembran und an der Proximität von ECM-bindenden Integrinen lokalisiert ist (Ross et al., 2001) und ein starker Aktivator der Pro-Gelatinase A (pro-MMP-2) ist (Zigrino et al., 2001; Hernandez-Barrantes et al., 2000). TIMP-2 ist als ein Inhibitor der MMP-2-Aktivität bekannt, trägt aber auch zur Aktivierung der pro-MMP-2 bei, involvierend die Bindung von proMMP-2 an einen membrangebundenen MT1-MMP/TIMP-2-Rezeptor-Komplex. TIMP-2 dient somit als Vermittler in der Progelatinase A-Aktivierung, indem es mit der C-terminalen Domäne an die Zink- katalytische Stelle der MT1MMP auf der Zellmembran bindet und auf diese Weise als eine Art Rezeptor für proMMP-2 fungiert. Die Hydrolyse der gebundenen proMMP-2 erfolgt dann durch eine benachbarte TIMP-2 freie MT1-MMP (Zucker et al., 1998). Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Beobachtung: Signifikant erhöhte Expression von MT1-MMP, TIMP-2 und MMP-2 in  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen könnten für die schwere ventrikuläre Dilatation von entscheidender Bedeutung sein. MMP-2, sezerniert als inaktives Proenzym, wird zunehmend proteolytisch in die aktive Form überführt. Die pro-MMP-2-Aktivierung durch MT1-MMP involviert die Bildung eines Komplexes aus MT1-MMP, TIMP-2 und proMMP-2 auf der Zelloberfläche, was die Hydrolyse der proMMP-2 durch eine benachbarte TIMP-2-freie MT1-MMP fördert. Der MT1MMP-TIMP-2-Komplex reduziert außerdem den intermolekularen autokatalytischen Turnover der MT1-MMP, was in einer Akkumulation aktiver MT1-MMP (57 kDa) auf der Zelloberfläche resultiert. Daraus kann man schließen, dass TIMP-2-freie MT1-MMP das verantwortliche Enzym ist für die Aktivierung der proMMP-2 in einem Tertiärkomplex unter physiologischen Bedingungen. Dieser Weg der MMP-2-Aktivierung ist auch in unserem  $\beta$ 1-AR-transgenen Mausmodell sehr wahrscheinlich.

Der genaue Mechanismus, mittels dessen die aktivierte MMP-2 zur dilatativen Kardiomyopathie mit Ersatzfibrose beiträgt, ist unbekannt. Angesichts jüngster Berichte über Signalgebungswege zwischen Extrazellulärmatrix und Myocyten/Fibrocyten und angesichts der Gelatinasenfunktion der MMP-2 drängt sich jedoch folgende Hypothese auf:

Die Gelatinasen, vor allem die aktivierte Gelatinase MMP-2 (72 kDa/ 66 kDa), spalten effizient nicht-fibrilläre Abbauprodukte der Kollagenasen wie Gelatine, Fibronectin und RGD-Protein-Sequenzen (Arg- Gly- Asp), die Fibronectin oder denaturiertes Kollagen Typ I mit Integrinen verbinden, die in der Zellmembran von Kardiomyozyten und Fibroblasten lokalisiert sind (Murphy et al., 1989; Davis et al., 1992). Integrine wiederum verknüpfen die Zellmembran von Fibroblasten und Myocyten mit extrazellulären Kollagen-Proteinen und sind wichtig für die Signalgebung zwischen dem Extrazellulärraum und intrazellulären Signalkaskaden, aber auch für die Signalgebung zwischen Fibroblasten und Myocyten. Die Integrin-verknüpfte Kinase (ILK, integrin-linked kinase) verknüpft Integrine mit Signaltransduktionswegen, die an der Suppression von Apoptose beteiligt sind (Dedhar et al., 1999; Delcommenne et al., 1998). Die ILK war in den 1 Jahr alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen signifikant erniedrigt (Seeland et al., 2007), somit wäre es gut vorstellbar, dass die aktivierte MMP-2 das ECM-vermittelte Überlebenssignal für Myocyten und Fibroblasten unterbricht: durch Spaltung von RGD-Sequenzen, Trennung von Fibronectin/denaturiertes Kollagen-Typ I von Zellmembran-gebundenen Integrinen. Diese Suppression der Integrin-Funktion würde Apoptose induzieren, gefolgt von erhöhter Kollagen-Synthese (Ersatzfibrose) und wiederum erhöhter MMP-Expression durch überlebende Fibroblasten und Kardiomyocyten.

### **5.2.2 Regulation der MMP-9 (Gelatinase B)**

Die Erstbeschreibung einer später als Gelatinase B bzw. MMP-9 bekannten Gelatinase, die aus menschlichen Leukozyten gewonnen wurde, stammt aus dem Jahre 1974 (Sopata et al., 1974). Die MMP-9 ist mit einem Molekulargewicht von 92 kDa

die größte Matrixmetalloproteinase (Collier et al., 1992), wird v.a. in Makrophagen, Keratinozyten sowie Zellen des Knochenstoffwechsel exprimiert und ist bei metastasierenden Prozessen maßgeblich an der Auflösung von Extrazellulärmatrix beteiligt (Kawashima et al., 1994; Kido et al., 1999; Yu et al., 1999). Ob die in dieser Studie gemessene MMP-9-Expression neutrophilen/granulozytären Ursprungs ist oder aber fibrocytären oder gar myocytären Ursprungs, ist nicht klar.

Die inaktive Proform von MMP-9 wird aktiviert durch verschiedene Zytokine (Okada et al., 1992; Murphy et al., 1995) sowie durch Zell-Zell-Kontakt (Lacraz et al., 1994). Die wichtigsten Zytokine zur Aktivierung des MMP-9-gesteuerten Abbaus von Extrazellulärmatrix sind TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 (Rao et al., 1999). Wobei TNF- $\alpha$  ein wichtiger Auslöser der Hochregulation von MMP-9 und TIMP-1 sein soll. Aktive MMP-9 wird wiederum inhibiert durch verschiedene Chemokine (Teronen et al., 1999; Wahl et al., 1993; Van den Steen et al., 2002) und durch sämtliche Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases, aber besonders durch TIMP-1. TIMP-1 bindet im Verhältnis 1:1 an MMP-9 und reguliert über eine Blockade des aktiven Zentrums die proteolytische Aktivität (Goldberg et al., 1992). Dies liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum es in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt zu einer Aktivierung der MMP-9 bei den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen kommt: Die TIMP-1 und MMP-9-Expression nehmen beide im Zeitverlauf ähnlich zu ohne signifikanten Unterschied zwischen den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen und der Wildtyp-Reihe, was zusätzlich einen altersabhängigen Effekt nahe legt.

Nichtsdestotrotz scheint auch die  $\beta$ 1-adrenerge Signaltransduktion einen gewissen Effekt auf die MMP-9/TIMP-1-Regulation zu haben: Sowohl die MMP-9- als auch die TIMP-1-Expression sind bei den 5 und 12 Monate alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen verstärkt, was jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Auch kann in der vorliegenden Arbeit keine Regulation der proMMP-9-mRNA-Expression nachgewiesen werden, so dass die altersabhängige Zunahme der proMMP-9 folglich auf post-translationelle Mechanismen zurückzuführen wäre.

## 5.3 Kollagenasen

Die Unterfamilie der Kollagenasen der humanen MMPs besteht aus drei Mitgliedern : MMP-1 (“fibroblast collagenase“, Interstitielle Kollagenase), MMP-8 (“neutrophil collagenase“), und die MMP-13 (Kollagenase-3). Die biochemische Charakterisierung aller dieser Kollagenasen zeigte, dass sie die Fähigkeit teilen, fibrilläre Kollagene zu spalten an einer spezifischen Peptidbindung, was in einer Generation von Fragmenten resultiert von ca.  $\frac{3}{4}$  und  $\frac{1}{4}$  -Größe vom ursprünglichen intakten Molekül. Die entstandenen Fragmente denaturieren spontan zu Gelatine bei physiologischer Temperatur und werden zugänglich für weiteren Verdau durch andere MMPs (Freije et al., 1994; Welgus et al., 1981; Hasty et al., 1987; Knäuper et al., 1996).

### 5.3.1 MMP-1 (Interstitielle Kollagenase)

MMP-1 baut vorzugsweise Typ-III-Kollagen ab (Welgus et al., 1981), und die MMP-13 baut TypII-Kollagen 6fach effektiver ab als Kollagen Typ I und III (Knäuper et al., 1996). Das Remodelling von fibrillärem Kollagen in murinem Gewebe wurde bisher in großem und ganzen auf die Aktivität der Kollagenase-3 (MMP-13) zurückgeführt, der Hauptkollagenase, die in dieser Spezies identifiziert wurde. Versuche, die interstitielle Kollagenase (MMP-1), die Hauptkollagenase in vielen Spezies, einschließlich dem Menschen, in Mäusen zu detektieren, blieben lange Zeit erfolglos. Vor kurzem wurde eine murine Kollagenase A (sog. Mcol-A) beschrieben von Balbin et al. (2001). Strukturelle und funktionelle Analysen suggerieren, dass Mcol-A als ein mögliches Gegenstück zur humanen MMP-1 erachtet werden kann (Balbin et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wird diese Mcol-A als murines Gegenstück zur humanen MMP-1 untersucht. Ähnlich der proMMP13 erfährt auch die proMMP1 eine solide Hochregulation im hypertrophen Myokard. Im Zeitverlauf zeigt sich sogar eine geringe MMP-1-Aktivierung. Wie die Daten zeigen, weisen jedoch auch die  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäuse nur vergleichsweise wenig murine MMP-1 (Mcol-A) auf (siehe Ergebnisse): Im Rahmen des Immunoblottings mußten konzentrierte Gewebshomogenate eingesetzt und die Gele mit doppelter Probenmenge beladen

werden, um eindeutige Banden zu erhalten. Zusätzlich zeigt die rekombinante Mcol-A proteolytische Aktivität gegenüber fibrillärem Kollagen der Typen I und II, wobei die spezifische Aktivität gegenüber fibrillärem Kollagen-Typ I aber viel niedriger ist als das, was bisher für die humane MMP-1 und MMP-13 beschrieben wurde (Balbin et al. 2001), was wiederum die zunehmende Myokardfibrose der  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäuse trotz MMP-1-Aktivierung im Alter von 12 Monaten erklären würde. Im Gegensatz dazu weisen transgene Mäuse mit myokardialer Überexpression von humaner MMP-1 (D'Armiento et al., 2002; Kim et al., 2000) einen Verlust an kardialen Kollagenen auf, einhergehend mit einer Verschlechterung der systolischen und diastolischen Funktion.

### **5.3.2 MMP-13 (Kollagenase-3)**

Die MMP-13 wird exprimiert in Chondrozyten und Fibroblasten als Antwort auf verschiedene Zytokine. Der Zeitverlauf der MMP-13-Induktion ist schneller und auch vorübergehender als der von MMP-1, was suggeriert, dass verschiedene Mechanismen die Expression der zwei Kollagenasen regulieren. In der vorliegenden Arbeit erfahren sowohl die proMMP-13 als auch die proMMP-1 eine solide Hochregulation im hypertrophen Myokard, jedoch wird nur die MMP-1 im Stadium der dilatativen Herzinsuffizienz zunehmend aktiviert. Die fehlende Aktivierung der MMP-13 als der Hauptkollagenase der Maus geht somit mit zunehmender interstitieller Myokardfibrose im Rahmen der Herzinsuffizienzentwicklung der  $\beta$ 1-AR-transgenen Maus einher. Auch wurden in diesem  $\beta$ 1-AR-transgenen Mausmodell - bis auf die gering exprimierte MMP-1, die keine große Rolle beim ECM-Remodelling der Maus spielen dürfte - außer der MMP-2-Aktivierung keine anderen Aktivierungen von MMPs beobachtet. Somit drängt sich die Vorstellung auf, dass die Aktivierung der latenten Gelatinase pro-MMP-2 (72 kDa), gemessen bei 66 kDa, eine entscheidende Rolle in diesem Übergangsprozess von kompensierter zu dekomensierter Herzinsuffizienz spielt.

## 5.4 TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases)

### 5.4.1 TIMP-1

Die TIMP-1-Proteinexpression erhöht sich sowohl in der WT-Gruppe als auch bei den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen mit zunehmendem Alter. Die Proteinzunahme ist bei den  $\beta$ 1-TG-Mäusen mit 12 Monaten ausgeprägter als bei den Kontrolltieren, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Diese Daten suggerieren eine Kontrollfunktion von TIMP-1 hinsichtlich der kardialen proteolytischen Aktivität von MMP-1 und MMP-13. Die fehlende MMP-9-Aktivierung kann ebenfalls mit den parallel zur MMP-9-Expression ansteigenden TIMP-1-Spiegeln erklärt werden. TIMP-1 inhibiert nämlich die Aktivität der meisten MMPs, mit Ausnahme von MMP-2 und MT1-MMP, was gut mit der MMP-2-Aktivierung mittels des MT1-MMP/TIMP-2/MMP-2-Tertiärkomplexes in den 1 Jahr alten  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen mit schwerer dilatativer Kardiomyopathie korreliert.

Obwohl schon verschiedene Studien die Expression von TIMP-1 im insuffizienten menschlichen Herzen untersucht haben, konnte keine Übereinstimmung gefunden werden zwischen Steady-State-Levels von TIMP-1 mRNA und der Menge an TIMP-1-Protein (Tyagi et al., 1996, Gunja-Smith et al., 1996). Auch in der vorliegenden Arbeit kann keine unmittelbare Übereinstimmung zwischen der TIMP-1-mRNA-Expression und TIMP-1-Proteinspiegeln festgestellt werden. Sowohl in der Wildtyp-Reihe als auch in der transgenen Reihe nimmt der TIMP-1-Gehalt ähnlich stark mit zunehmendem Alter zu, aber nur in den  $\beta$ 1-AR-transgenen Mäusen kann auch eine Zunahme der TIMP-1-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine vom  $\beta$ 1-adrenergen Signalweg weitgehend unabhängige Regulation der TIMP-1-Expression.

TIMP-1 scheint somit eine physiologische Hochregulation mit zunehmendem Alter zu erfahren, möglicherweise im Sinne einer Schutzfunktion: Es ist schon demonstriert

worden, dass TIMP-1-Defizienz LV-Remodelling nach Myokardinfarkt in Mäusen vervielfacht, was eine wichtige Rolle der lokalen endogenen Kontrolle von kardialer MMP-Aktivität durch TIMP-1 suggeriert (Creemers et al., 2002). Es wurde auch gezeigt, dass TIMP-1 vollständigen Schutz bietet gegen Ventrikelruptur in Mäusen nach experimenteller Myokardinfarktsetzung (Heymans et al., 1999).

## **5.5 Modulation der MMP-Aktivität verändert das Fortschreiten der Herzinsuffizienz**

Es gibt viele potentielle Wege um MMPs zu inhibieren, einschließlich der Suppression der MMP-Gen-Expression, Blockierung der MMP-Aktivierungswege, Inhibition der MMPs durch verstärkte TIMP-Gen-Expression oder Verabreichung von synthetischen MMP-Inhibitoren (Woessner et al., 1999). Gegenwärtig gibt es keine Daten zur Modulation der Aktivierungswege der MMPs in vivo. Eine Verstärkung der TIMP-Gen-Expression könnte in Zukunft machbar sein, wenn Gentherapie-Techniken ausgereift sind (George et al., 2000). Die Verabreichung von TIMPs hat sich als nicht geeignet erwiesen für die pharmakologische Anwendung angesichts ihrer kurzen Halbwertszeit in vivo, obwohl gezeigt wurde dass TIMP-1 vollständigen Schutz bietet gegen Ventrikelruptur in Mäusen nach experimenteller Myokardinfarktsetzung (Heymans et al., 1999). Tier-Modelle und anfängliche Ergebnisse mit synthetischen MMP-Inhibitoren waren vielversprechend (Peterson et al., 1997; Spinale et al., 1999). Sowohl an der Ratte als auch am Schweine-Herzinsuffizienzmodell konnte der oral verabreichte MMP-Inhibitor PD 166793 die kardiale Pumpfunktion verbessern und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz aufhalten (Peterson et al., 1997; Spinale et al., 1999). Die MMP-Inhibition verringert auch signifikant das myokardiale Remodelling assoziiert mit chronischer Volumenbelastung, verhindert ventrikuläre Dilatation, reduziert die LV-Hypertrophie und erhält die Ventrikelfunktion (Chancey et al., 2002). Ein gemeinsames Ergebnis der obigen Modelle ist die Bewahrung der Integrität der Kollagen-Matrix und der myokardialen Funktion und in unterschiedlichem Masse auch der Herzstruktur und -geometrie. In Fällen, in denen die MMP-Inhibition den

Kollagen-Gehalt nicht veränderte, könnte der günstige Effekt in der Verbesserung der Kollagen-Qualität und der ECM-Integrität liegen (Witte et al., 1998). Der relative Gehalt an verschiedenen Kollagen-Typen, die Ausprägung des Kollagen-cross-linking, der Ausrichtung/Gruppierung, Reifung und Denaturierung, all das trägt zur Stärke, Festigkeit und Integrität der extrazellulären Matrix bei. Jedoch müssen die Ergebnisse mit großer Sorgfalt evaluiert werden. So sind MMPs z. B. gleichfalls entscheidend für den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt und eine generelle MMP-Hemmung wäre mit schwerwiegenden gesundheitlichen Nachteilen verbunden.

Die oben geschilderten Ergebnisse zeigen, dass MMP-Aktivierung eine Schlüsselrolle spielt in der Modulation der Myokardfunktion durch Regulation des ECM-Remodellings. Somit könnte eine selektive MMP-Inhibition als potentielle therapeutische Strategie dienen für Herzinsuffizienz, wenn auch unter Beachtung eines engen Zeitfensters während der Herzinsuffizienzentwicklung.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Antos CI, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN (2001) Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ Res* 89: 997- 1004
2. Badenhorst D, Velietes D, Maseko M, Tsotetsi OJ, Brooksbank R, Naidoo A, Woodiwiss AJ, Norton GR (2003) Beta-adrenergic activation initiates chamber dilatation in concentric hypertrophy. *Hypertension* 41: 499-504
3. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 , -2 , or -3 over expression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101: 1478-1487
4. Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Lopez JM, Alvarez J, Sanchez LM, Quesada V, Bordallo J, Murphy G, Lopez-Otin C (2001) Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase ( MMP-1 ) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* 276: 10253-10262
5. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P (1994) Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 89: 151-163
6. Berkowitz R (2004) B-type natriuretic peptide and the diagnosis of acute heart failure. *Rev Cardiovasc Med* 5: 3-16
7. Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ (1990) Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 22: 1157-1165
8. Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ (2000) Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 32: 817-830
9. Böhm M, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Näbauer M, Kemkes B, Erdmann E (1988) Reduction of  $\beta$ -adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic response in isolated, diseased human myocardium. *Eur Heart J* 9: 844-852

10. Böhm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, Kreuzer E, Weinhold C, Erdmann E (1988) Subsensitivity of the failing human heart to isoprenaline and milrinone is related to  $\beta$ -adrenoceptor downregulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 12:726-732
11. Böhm M, Beuckelmann D, Diet F, Feiler G, Lohse MJ, Erdmann E (1988) Properties of cardiac  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338: 383-391
12. Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E (1990) Increase of  $G_i$   $\alpha$  in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82: 1249-1265
13. Böhm M, La Rosee K, Schwinger RH, Erdmann E (1995) Evidence for reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 25: 146-153
14. Borg TK, Burgess ML (1993) Holding it all together: organisation and function(s) of the extracellular matrix of the heart. *Heart Failure* 8: 230-238
15. Briest W, Hölzl A, Raßler B, Deten A, Leicht M, Baba HA, Zimmer HG (2001) Cardiac Remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res* 52: 265-273
16. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211
17. Bristow MR, Anderson FL, Port D, Skerl L, Hershberger R, Larrabee P, O'Connell JB, Renlund DG, Volkmann K, Murray J, Feldmann AM (1991) Differences in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 84: 1024-1039
18. Bristow MR (2000)  $\beta$ -Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 101: 558-569
19. Brodde OE (1991)  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -Adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43: 203-242
20. Buxton IL, Brunton LL (1985) Direct analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. *Circ Res* 56: 126-132
21. Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS (2002) Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation* 105: 1983-1988

22. Chapman D, Weber KT, Eghbali M (1990) Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67: 787-794
23. Chromczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
24. CIBIS II Investigators and Committees (1999) The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS II): a randomised trial. *Lancet* 353: 9-13
25. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1281-1292
26. Cohn JN, Johnson GR, Shabetai R, Loeb H, Tristani F, Rector T, Smith R, Fletcher R (1993) Ejection fraction peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 87: 5-16
27. Cohn JN (1989) The sympathetic nervous system in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 14: 57-61
28. Cohn JN (1990) Abnormalities of peripheral sympathetic nervous system control in congestive heart failure. *Circulation* 82: I 59- I 67
29. Cohn JN (2000) ACE inhibition and vascular remodelling of resistance vessels: vascular compliance and cardiovascular implications. *Heart Dis.* 2: 2-6
30. Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG (1999) Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol* 277: H777-H787
31. Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG (2001) Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H543-551
32. Collier IE, Krasnov PA, Strongin AY, Birkedal-Hansen H, Goldberg GI (1992) Alanine scanning mutagenesis and functional analysis of the fibronectin-like collagen-binding domain from human 92-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 267: 6776-6781

33. Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C (2000) Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. Review.  
J Card Fail 6: 1-7
34. Communal C, Ribuo C, Durand A, Demenge P (1998) Myocardial beta-adrenergic reactivity in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. Fundam Clin Pharmacol 12: 590-598
35. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS (1998) Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. Circulation 98: 1329-1334
36. Communal C, Singh M, Menon B, Xie Z, Colucci WS, Singh K (2003) Beta 1 integrins expression in adult rat ventricular myocytes and its role in the regulation of beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis.  
J Cell Biochem 89: 381-388
37. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL (1995) Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. Circulation 91: 161-170
38. Covell JW (1990) Factors influencing diastolic function: possible role of the extracellular matrix. Circulation 81: III-155-III-158
39. Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, Hauet AM, Escobar PG, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Zile MR, Spinale FG (2002) Deficiency of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 exacerbates LV-Remodeling following myocardial infarction in mice.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol
40. D'Armiento J (2002) Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac Dysfunction. Trends Cardiovasc Med 12: 97-101
41. Davis GE (1992) Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites.  
Biochem Biophys Res Commun 182: 1025-1031
42. Dedhar S, Williams B, Hannigan G (1999) Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signalling. Review.  
Trends Cell Biol 9: 319-323
43. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B / AKT by the integrin-linked kinase.  
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 112-116

44. Dhalla NS, Pierce GN, Panagia V, Singal PK, Beamish RE (1982) Calcium movements in relation to heart function. *Res Cardiol* 77: 117-139
45. Duncan ME, Richardson JP, Murray GI, Melvin WT, Fothergill JE (1998) Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form. *Eur J Biochem* 258: 37-43
46. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta 1-adrenergic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7059-7064
47. Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, Hein L (2001) Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice over expressing the beta 1-adrenergic receptor. *FASEB J* 15: 2718-2720
48. Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klämbdt K, Lohse MJ (2002) Inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res* 90:814-819
49. Eriksson H, Svardsudd K, Larsson B, Ohlson LO, Tibblin G, Welin L, Wilhelmsen L (1989) Risk factors for heart failure in the general population: the study of men born in 1913. *Eur Heart J* 10: 647-656
50. Factor SM (1994) Role of extracellular matrix in dilated cardiomyopathy. *Heart Failure* 9: 260-268
51. Fowler MB, Laser JA, Hopkins GL, Minobe W, Bristow MR (1986) Assessment of the adrenergic receptor pathway in the intact failing human heart: progressive receptor down-regulation and subsensitivity to agonist response. *Circulation* 74:1290-1302
52. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C (1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-16773
53. Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7920-7924.
54. Gage J, Rutman H, Lucido D, Le JT (1986) Additive effects of dobutamine and amrinone on myocardial contractility and ventricular performance in patients with severe heart failure. *Circulation* 74: 367-373

55. Gaussin V, Tomlinson JE, Depre C, Engelhardt S, Antos CL, Takagi G, Hein L, Topper JN, Liggett SB, Olson EN, Lohse MJ, Vatner SF, Vatner DE (2003) Common genomic response in different mouse models of  $\beta$ -adrenergic-induced cardiomyopathy. *Circulation* 108: 2926-2933
56. George SJ, Lloyd CT, Angelini GD, Newby AC, Baker AH (2000) Inhibition of late vein graft neointima formation in human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Circulation* 101: 296-304
57. Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P, Thompson EW (1997) Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Lab Invest* 76: 651-660
58. Gilman AG (1987) G-proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649
59. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267: 4583-4591
60. Goldstein DS (1983) Plasma catecholamines and essential hypertension. *Hypertension* 5: 86-99
61. Goldstein DS, Kopin IJ (1990) The autonomic nervous system and catecholamines in normal blood pressure control and in hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM (eds) *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Raven Press Publishers, New York, pp 711-747
62. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 14: 111-122
63. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF Jr (1996) Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 148: 1639-1648
64. Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP (2000) EMMPRIN (CD 147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res* 60: 888-891

65. Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP (1987) Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61: 70-76
66. Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998) Three-dimensional type-I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 3604-3610
67. Hasty KA, Jeffrey JJ, Hibbs MS, Welgus HG (1987) The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 262: 10048-10052
68. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB J* 4: 2881-2889
69. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A (2003) Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:1229-1235
70. Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ (1997) Overexpression of the angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Sci USA* 94: 6391-6396.
71. Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, Sang QA, Fridman R (2000) Binding of active ( 57 kDa ) membrane type 1- matrix metalloproteinase ( MT1-MMP ) to tissue inhibitor of metalloproteinase ( TIMP ) -2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 275: 12080-12089
72. Hess OM, Schneider J, Koch R, Bamert C, Grimm J, Krayenbuehl HP (1981) Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. *Circulation* 63: 360-371
73. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P (1999) Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 5: 1135-1142
74. Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S (2002) Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 39: 1384-1391

75. Iwase M, Bishop SP, Uechi M, Vatner DE, Shannon RP, Kudej RK, Wight DC, Wagner TE, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF (1996) Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac G alpha over expression. *Circ Res* 78: 517-524
76. Janicki JS, Matsubara BB, Kabour A (1993) Myocardial collagen and its functional role. *Adv Exp Med Biol* 346: 291-298
77. Jarai R, Wojta J, Huber K (2005) Circulating B-type natriuretic peptides in patients with acute coronary syndromes. Patho-physiological, prognostical and therapeutical considerations. *Thromb Haemost* 94: 926-932
78. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ (1994) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 160: 194-202
79. Junquera LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 11: 447-455
80. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M (1972) Role of blood pressure in the development of the congestive heart failure. The Framingham study. *N Engl J Med* 287: 781-787
81. Kannel WB, Cupples A (1988) Epidemiology and risk profile of cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2: 387-395
82. Kannel WB (1991) Left ventricular hypertrophy as a risk factor: the Framingham experience. *Hypertension* 9: 53-59
83. Kawashima A, Nakanishi I, Tsuchiya H, Roessner A, Obata K, Okada Y (1994) Expression of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase / type IV collagenase) induced by tumour necrosis factor alpha correlates with metastatic ability in a human osteosarcoma cell line. *Virchows Arch* 424: 547-552
84. Kido A, Tsutsumi M, Iki K, Takahama M, Tsujiuchi T, Morishita T, Tamai S, Konishi Y (1999) Overexpression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcomas in rats. *Cancer Lett* 137: 209-216
85. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J (2000) Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 106: 857-866



86. Knäuper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271: 1544-1550
87. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM (1994) Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 269: 22027-22033
88. Latini R, Masson S, Anand I, Judd D, Maggioni AP, Chiang YT, Bevilacqua M, Salio M, Cardano P, Dunselman PH (2002) Effects of valsartan on circulating brain natriuretic peptide and norepinephrine in symptomatic chronic heart failure: The Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 106: 2454-2458
89. Latour-Perez J, Coves-Orts FJ, Abad-Terrado C, Abaira V, Zamora J (2005) Accuracy of B-type natriuretic peptide levels in the diagnosis of left ventricular dysfunction and heart failure: A systematic review. *Eur J Heart Fail* 2005
90. Laufs U, Erdmann E (1999) Therapie der Herzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern. *Herz/Kreis* 31: 363-366
91. Lee RT (2001) Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure. *Trends Cardiovascular Med* 11:202-205
92. Leicht M, Greipel N, Zimmer HG (2000) Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture. *Cardiovasc Res* 48: 274-284
93. Levy D, Larson MG, Vasom RS, Kannel WB, Ho KK (1996) The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275: 1557-1562
94. Li N, Wang J (2005) Brain natriuretic peptide and optimal management of heart failure. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B: 877-884
95. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF (1998) Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 98: 1728-1734
96. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM (1999) Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 42: 162-172
97. Li YY, Feng Y, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM (2000) Myocardial extracellular matrix remodelling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97: 12746-12751

98. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodelling. *Cardiovasc Res* 46: 214- 224
99. Liu S, Rose DM, Han J, Ginsberg MH (2000) Alpha4 integrins in cardiovascular development and diseases. *Trends Cardiovasc Med* 10: 253-257
100. Lohse MJ, Engelhardt S (2001) Protein Kinase A transgenes - the many faces of cAMP. *Circ Res* 89: 938-940
101. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of  $\beta$ -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93: 896-906
102. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB (2002) Lifetime risk for developing congestive heart-failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106: 3068-3072
103. Lowry OH, Rosebrough NJ (1951) Protein measurement. *J Biol Chem* 193: 265-275
104. Mann DL, Spinale FG (1998) Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* 98: 1699-1702
105. MERIT-HF (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure. *Lancet* 353: 2001-2007.
106. Mujumdar VS, Tyagi SC (1999) Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *Hypertension* 17: 261-270
107. Mukherjee D, Sen S (1990) Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 67: 1474-1480
108. Mukherjee D, Sen S (1991) Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 88: 1141-1146
109. Murdoch DR, McDonough TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, Dargie HJ (1999) Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic peptide concentration: randomized comparison of the hemodynamic and neuroendocrine effects of tailored versus empirical therapy. *Am Heart J* 138: 1126-1132

110. Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K (1989) Characterization of gelatinase A from pig polymorphonuclear leucocytes . *Biochem J* 258: 463-472
111. Murphy G, Willenbrock F (1995) Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248: 496-510
112. Murphy G, Crabbe T (1995) Gelatinases A and B. *Methods Enzymol* 248: 470-484
113. Nagase H, Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494
114. Nemeth JA, Rafe A, Steiner M, Goolsby CL (1996) TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration - and cell type-specific response in the presence of insulin. *Exp Cell Res* 224: 110-115
115. Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ (1997) Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 96: 1991-1998
116. Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T (1992) Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267: 21712-21719
117. Packer M (1988) Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. Review. *Circulation* 77: 721-730
118. Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, Staiger C, Curtin EL, DeMets DL (2001) For the carvedilol prospective randomized cumulative survival study group. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 22: 1651 -1658
119. Parameshwar J, Keegan J, Sparrow J, Sutton GC, Poole-Wilson PA (1992) Predictors of prognosis in severe chronic heart failure. *Am Heart J* 123: 421 - 426
120. Pei D, Weiss SJ (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271: 9135-9140

121. Peterson JT, Rosebury WS, Robertson AW, Washington RA, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Hallak H, Uprichard ACG, Bocan TMA (1997) Matrix metalloproteinase inhibition blocks progression of heart failure. *Circulation* 96: I-520 (Abstract)
122. Rao CN, Mohanam S, Puppala A, Rao JS (1999) Regulation of proMMP-1 and proMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2 /matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 94-98
123. Rao VH, Singh RK, Delimont DC, Schaefer GB, Bridge JA, Neff JR, Sanger WG, Sappenfield JW, Buehler BA, Finnell RH (1999) Interleukin-1 beta upregulates MMP-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone. *J Interferon Cytokine Res* 19: 1207-1217
124. Reid IA (1992) Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol* 262: E763-E778
125. Ries C, Petrides PE (1995) Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 345-355
126. Ross RS, Borg TK (2001) Integrins and the myocardium. *Circ Res* 88: 1112-1119
127. Rossi MA, Abreu MA, Santoro LB (1998) Images in cardiovascular medicine. Connective tissue skeleton of the human heart: a demonstration by cell-maceration scanning electron microscope method. *Circulation* 97: 934-935
128. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T (2004) Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation* 109: 2143-2149
129. Sanderson JE, Chan WW, Hung YT, Chan SK, Shum IO, Raymond K, Woo KS (1995) Effect of low dose beta blockers on atrial and ventricular (BType) natriuretic factor in heart failure: A double blind, randomised comparison of metoprolol and a third generation vasodilating beta blocker. *Br Heart J* 74: 502-507

130. Santavicca M, Noel A, Angliker H, Stoll I, Segain JP, Anglard P, Chretien M, Seidah N, Basset P (1996) Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin -3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J* 315: 953-958
131. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M (1996) Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* 393: 101-104
132. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P (1997) Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signalling in plaque rupture? *Circ Res* 81: 448-54
133. Schwartz A, Lindenmayer GE, Harigaya S (1968) Respiratory control and calcium transport in heart mitochondria from the cardiomyopathic Syrian hamster. *Trans N Y Acad Sci* 30: 951-954
134. Seeland U, Kouchi I, Zolk O, Itter G, Linz W, Bohm M (2002) Effect of ramipril and furosemide treatment on interstitial remodeling in post-infarction heart failure rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 34: 151-163
135. Seeland U, Selejan S, Engelhardt S, Müller P, Lohse MJ, Böhm M (2007) Interstitial remodeling in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic Res Cardiol* 102: 183-193
136. Sharpe N, Doughty R (1998) Epidemiology of heart failure and ventricular dysfunction. *Lancet* 352: 3-7
137. Sopata I, Dancewicz AM (1974) Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 370: 510-523
138. Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tyynela J, Konttinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkilä P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S, Stenman UH (1997) Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 272: 21067-21074
139. Spinale FG, Zellner JL, Johnson WS, Eble DM, Munyer PD (1996) Cellular and extracellular remodeling with the development and recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy: changes in fibrillar collagen, myocyte adhesion capacity and proteoglycans. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1591-1608

140. Spinale FG, Coker ML, Thomas CV, Walker JD, Mukherjee R, Hebbar L (1998) Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function. *Circ Res* 82: 482-495
141. Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR (1999) Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions- and function. *Circ Res* 85: 364-376
142. Spinale FG (2002) Bioactive peptide signalling within the myocardial interstitium and the matrix metalloproteinases. *Circ Res* 91: 1082-1084
143. Spindler M, Engelhardt S, Niebler R, Wagner H, Hein L, Lohse MJ, Neubauer S (2003) Alterations in the myocardial creatine kinase system precede the development of contractile dysfunction in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 35: 389-397
144. Starke K (1971) Action of angiotensin on uptake, release and metabolism of  $^{14}$ C NE by isolated rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 14: 112-123
145. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
146. Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1993) Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem* 268: 14033-14039
147. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338
148. Sullivan DR, West M, Jeremy R (2005) Utility of brain natriuretic peptide (BNP) measurement in cardiovascular disease. *Heart Lung Circ* 14:78-84
149. Sutton MG, Sharpe N (2000) Left ventricular remodelling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101: 2981-2988
150. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal S (1964) Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78: 69-72
151. Tamai K, Ishikawa H, Mauviel A, Uitto J (1995) Interferon-gamma coordinately upregulates matrix metalloprotease (MMP)-1 and MMP-3, but not tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP), expression in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 104: 384-390

152. Teronen O, Heikkilä P, Konttinen YT, Laitinen M, Salo T, Hanemaaijer R, Teronen A, Maisi P, Sorsa T (1999) MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci* 878: 453-465
153. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3<sup>rd</sup>, Spinale FG (1998) Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 97: 1708-1715
154. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr (2002) Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 91: 1127-1134
155. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T (2001) Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodelling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37: 1228-1233
156. Tyagi SC, Kumar SG, Haas SJ, Reddy HK, Voelker DJ, Hayden MR, Demmy TL, Schmaltz RA, Curtis JJ (1996) Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1415-1428
157. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ (1996) Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem* 155: 13-21
158. Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993) Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87: 454-463
159. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375-536
160. Van Veldhuisen DJ, Genth-Zotz S, Brouwer J, Boomsma F, Netzer T, Man In't Veld AJ, Pinto YM, Lie KI, Crijns HJ (1998) High- versus low-dose ACE-inhibition in chronic heart failure: A double-blind, placebo-controlled study of imidapril. *J Am Coll Cardiol* 32: 1811-1818
161. Wahl LM, Corcoran ML (1993) Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J Periodontol* 64: 467-473

162. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI (1988) Collagen remodelling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 62: 757-765
163. Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13: 1637-1652
164. Weber KT, Brilla CG (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83: 1849-1865
165. Weber KT, Brilla CG (1992) Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. *Basic Res Cardiol* 87: 291-301
166. Weber KT, Sun T, Tyagi SC, Cleutjens JPM (1994) Collagen network of the myocardium: function, structural remodelling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 26: 279-292
167. Weber KT (1997) Extracellular matrix remodelling in heart failure - a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96: 4065-4082
168. Weber KT (1997) Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* 96: 2488-2492
169. Weber KT (1997) Metabolic responses of extracellular matrix in tissue repair. *Ann Med* 29: 333-338
170. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1981) The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J Biol Chem* 256: 9511-9515
171. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PWT, Whitlock RML, Wild CJ (1987) Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 76: 44-51
172. Whittaker P (1995) Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 29:758-762
173. Willich SN, Reinhold T, Lenz C, Brüggengjürgen B (2005) Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt in Deutschland - ökonomische Bedeutung und Einschränkung der Lebensqualität. *Pharmaco Economics German Research Articles* 3 : 25-39
174. Witte MB, Thornton FJ, Kiyama T, Efron DT, Schulz GS, Moldawer LL, Barbul A (1998) Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery* 124: 464-470.



175. Woessner JF Jr. (1999) Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 878: 388-403
176. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR (2001) Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 103: 155-160
177. Yu Q, Stamenkovic I (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13: 35-48
178. Zigrino P, Drescher C, Mauch C (2001) Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of  $\alpha 2 \beta 1$  integrins. *Eur J Cell Biol* 80: 68-77
179. Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck Y, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJP, Cao J (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 273: 1216-1222

## 7. Publikationen

### Originalarbeiten:

Seeland U, Selejan S, Engelhardt S, Müller P, Lohse MJ, Böhm M (2007)  
Interstitial remodeling in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice.  
Basic Res Cardiol 102: 183-193

### Poster und Vorträge:

Seeland U , Selejan S , Engelhardt S , Müller P , Lohse M. J. , Böhm M (2001)  
Overexpression of Cardiac  $\beta$ 1-Adrenoceptors leads to Activation of Matrix  
Metalloproteinases in Vivo .  
DMW , 126 , Suppl.3 : S. 173

Seeland U , Selejan S , Engelhardt S , Müller P , Lohse M. J. , Böhm M (2002)  
Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen beim Übergang von der Hypertrophie zur  
Herzinsuffizienz in  $\beta$ 1-Adrenorezeptor transgenen Mäusen .  
Z. Kardiologie , 91, Suppl. 1 , S. 317

Seeland U , Selejan S , Engelhardt S , Müller P , Lohse M. J. , Böhm M (2002)  
Überexpression des  $\beta$ 1-Adrenozeptors im Myokard führt zu strukturellen  
Veränderungen des Interstitiums .  
Medizinische Klinik , 97 , S.110

Seeland U , Selejan S , Engelhardt S , Müller P , Lohse M. J. , Böhm M (2002) :  
Overexpression of Cardiac  $\beta$ 1-Adrenoceptors leads to Activation of Matrix  
Metalloproteinases in Vivo .  
ESC Congress , Berlin, 31.August - 4 .September

Seeland U , Selejan S , Engelhardt S , Müller P , Lohse M. J. , Böhm M (2004) :  
MMP/TIMP dysregulation in mice myocardium as a contributing factor for ventricular  
dilation .  
Eur J Heart Failure , 3 : 122

## 8. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. M. Böhm gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die vorgelegten Experimente im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes durchführen zu können. Zusätzlich gilt ihm mein besonderer Dank für seine engagierte Betreuung und seine außerordentliche Fähigkeit, Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken, was die hier vorgelegte Arbeit erst ermöglicht hat.

Frau Dr. U. Seeland danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, für die Unterstützung bei der Planung der Experimente und für ihre ständige Ansprechbarkeit bei der Erstellung dieser Arbeit. Zusätzlich danke ich ihr für die kritische Begutachtung der Manuskriptvorlagen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. P. Müller, der mich als erster in die molekularbiologischen Methoden eingearbeitet hat. Ich danke ihm besonders für seine durchaus motivierende und weiterführende Beratung und für die stete Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. S. Engelhardt danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung der Versuchstiere.

Frau Julia Michaely danke ich für die Einarbeitung im Labor und das Einweisen in die verschiedenen Arbeitstechniken und für ihre ständige Bereitschaft zur Unterstützung in allen Abschnitten dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitdoktoranden/innen, Assistenzärzten/innen und technischen Assistentinnen des Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung während diesen Jahren.

## 9. Lebenslauf

### **Persönliche Daten :**

Name : Selejan  
Vorname : Simina-Ramona  
Geburtsdatum : 13.02.1979  
Geburtsort : Temeschburg /Rumänien  
Staatsangehörigkeit : deutsch  
Eltern : Georg Selejan  
Dora Selejan , geb. Rominescu

### Schullaufbahn :

1986-1990 Grundschule Pesac ( Rumänien )  
 1990-1991 Realschule Temeschburg ( Rumänien )  
 Juni 1990 : Einreise nach Deutschland  
 1990-1991 Hauptschule Wirges / Weilerbach  
 1991-1998 Staatliches Gymnasium Heinrich-Heine in Kaiserslautern  
 1998 Abitur

### Universitätslaufbahn :

**Oktober 1998-Mai 2005 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes  
( Standort Homburg-Saar )**

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
Sommer 2000	Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004 - März 2005	Praktisches Jahr an der Universität des Saarlandes ( Universitätskliniken Homburg-Saar ) und an der Universität Zürich ( Kantonsspital Schaffhausen , Abteilung für Anästhesiologie )
02.05.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 2001	Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Innere Medizin III der Universitätskliniken des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm)
Ab 01.04.2006	Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik Innere Medizin III der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm)

Homburg, 01.09.2007

Simina-Ramona Selejan

